

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

## ACTION DE LA CHLORPROMAZINE SUR L'INTOXICATION ET L'INFECTION EXPÉRIMENTALES DE LA SOURIS PAR LA TOXINE ET LES VIBRIONS CHOLÉRIQUES

par J. GALLUT (\*).

(Institut Pasteur)

L'action de la chlorpromazine sur diverses intoxications bactériennes expérimentales a fait l'objet de plusieurs travaux [1 à 5], qui ont montré que cette substance protégeait la souris contre les endotoxines (extraites par la méthode de Boivin pour la plupart) d'*E. coli*, *S. typhosa*, *S. paratyphi* B, *S. typhi murium* et *Brucella*, tandis qu'elle n'agissait pas sur les exotoxines diphtérique, tétanique et de *Cl. histolyticum* et aggravait même l'action de la toxine de *W. perfringens*. L'action de la chlorpromazine sur les bactéries mêmes a été moins étudiée ; on a signalé cependant [4] qu'elle ne modifiait pas l'infection par le streptocoque et qu'elle aggravait celles du pneumocoque (par voie nasale) et de *S. typhi murium*, chez la souris également.

A notre connaissance, l'action de la chlorpromazine dans le choléra, soit en essais cliniques chez l'homme, soit en expérimentation sur l'animal, n'a fait l'objet d'aucune publication. Si

(\*) Manuscrit reçu le 11 juillet 1960.

l'on en juge par son action sur les endotoxines extraites par l'acide trichloracétique, il semblerait que l'on puisse s'attendre à une action favorable de cette substance sur les effets d'une partie au moins de la toxine cholérique. On sait, en effet, par nos recherches déjà anciennes [6] et par celles plus récentes de Freter [7] et de Jenkin [8], que la toxine cholérique se compose d'au moins deux fractions toxiques différentes, peut-être liées à l'origine en un complexe mais isolables spontanément : l'une thermostable entérotrope, identique selon nous au « glucidolipide » type de l'endotoxine de Boivin, l'autre thermolabile neurotrope, protidique comme les exotoxines. Probablement inactive sur la seconde fraction, la chlorpromazine devrait, si elle se comportait dans l'intoxication cholérique comme dans les autres intoxications par endotoxines, s'opposer au moins à l'action de la fraction thermostable entérotrope.

D'autre part, nous avons montré avec Jude [9, 10], que *V. cholerae* est soumis à des variations de virulence en fonction de la température de son incubation, liées aux variations identiques de son pouvoir toxigène. Comme ces variations peuvent être dues à une modification, en fonction de la température, des proportions des deux fractions toxiques précitées, il nous paraissait intéressant d'étudier expérimentalement l'action de la chlorpromazine sur l'infection par *V. cholerae* et sur l'intoxication par sa toxine, après incubation des vibrons et préparation de la toxine à des températures différentes.

Les expériences que nous rapportons ici ont donc été faites en traitant par la chlorpromazine des souris recevant des toxines cholériques ou des suspensions de *V. cholerae* préparés ou cultivés à trois températures différentes.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° *V. cholerae*. Trois souches récemment isolées ont été utilisées : une Inaba et deux Ogawa, provenant toutes de l'Inde. Les cultures ont été faites sur gélose peptonée, pH 8,0, à 20°, 37° et 41°. Les vibrons ont été inoculés en suspension isotonique sans mucine.

2° *Toxine cholérique*. Elle a été préparée suivant notre méthode personnelle [10] à 20°, 37° et 41°. Chaque millilitre correspond à l'équipement toxique de  $800 \times 10^9$  vibrons.

3° *Titrage de la virulence et de la toxicité*. Ils ont été faits sur des lots de 30 souris blanches de 15 g réparties en 5 groupes de 6 par lot ; chaque groupe recevant des doses de vibrons ou de toxine en progression de raison 2. Toutes ces doses ont été administrées par voie péritonéale sous le volume de 0,5 ml. Les résultats ont été notés après soixante-douze heures d'observation. Les doses létales 50 p. 100 et leurs limites de confiance ont été calculées par la méthode de Bonét-Maury, Jude et Servant [11].

4° *Chlorpromazine* (1). Cette substance a été injectée par voie sous-cutanée à des doses allant de 4 à 20 mg par kilogramme de poids, sous un volume de 0,2 ml. Ces quantités, toutes inférieures à la dose toxique pour la souris (DL50 p. 100 = 50 à 60 mg/kg), provoquent chez cet animal une somnolence et une hypothermie débutant en trente minutes environ et durant de six à douze heures.

## RÉSULTATS

### I. — INTOXICATION PAR LA TOXINE CHOLÉRIQUE.

Les résultats de toutes les expériences d'intoxication sont réunis dans le tableau I.

a) *Vibrions morts*. Une expérience préliminaire a été faite avec les vibrions Ogawa n° 23, cultivés vingt-quatre heures à 20°, tués

TABLEAU I. — Action de la chlorpromazine (CPZ) sur l'intoxication cholérique de la souris. La chlorpromazine et la cortisone ont été administrées une heure avant le matériel toxique.

N° EXPÉRIENCE SOUCHE	MATÉRIEL	TRAITEMENT	DL 50 %	LIMITES DE CONFIANCE		RAPPORT DL 50 TRAITÉS DL50 TÉMOINS
				INF.	SUP.	
n° 1 Ogawa 23	vibrions tués à 100°	néant CPZ 5 mg/k	9,2 x 10 <sup>9</sup> 7,2 x 10 <sup>9</sup>	4,6 3,6	18,4 14,4	0,78
n° 2 Ogawa 23	toxine 24 h à 20°	néant CPZ 10 mg/k	0,043 ml 0,015 ml	0,020 0,008	0,903 0,025	0,44
n° 3 Ogawa 23	toxine 28 h à 20°	néant CPZ 10 mg/k	0,034 ml 0,023 ml	0,017 0,014	0,064 0,036	0,64
n° 4 Inaba 200	toxine 28 h à 20°	néant CPZ 20 mg/k CPZ 20 mg/k + cortisone 2 mg	0,300 ml 0,105 ml 0,500 ml	0,210 0,052 0,293	0,450 0,200 0,850	0,35 1,66
n° 5 Ogawa 144	toxine 4 h à 37°	néant CPZ 10 mg/k	0,200 ml 0,095 ml	0,087 0,050	0,440 0,180	0,47
n° 6 Ogawa 144	toxine 4 h à 41°	néant CPZ 20 mg/k	0,445 ml 0,040 ml	0,287 0,025	0,689 0,062	0,09

(1) Largactil (4560 R. P.) injectable.



par chauffage à 100° pendant cinq minutes. Une dose de 5 mg/kg de chlorpromazine administrée une heure avant les vibriions abaisse la DL50 des souris traitées à  $7,3 \times 10^9$  contre  $9,2 \times 10^9$  pour les témoins.

b) *Toxine préparée à 20°*. Deux expériences avec deux préparations différentes de toxine du vibron Ogawa 23 (vingt-quatre heures et vingt-huit heures à 20°) ont situé les DL50 respectives des souris ayant reçu 10 mg/kg de chlorpromazine à 0,015 ml et 0,023 ml contre 0,043 et 0,034 ml pour les témoins.

Dans une autre expérience, pratiquée avec la toxine du vibron Inaba 200, les souris traitées étaient réparties en deux lots : le premier recevant 20 mg/kg de chlorpromazine, le second la même dose plus 2 mg par souris de cortisone. Les DL50 furent respectivement 0,105 et 0,500 ml, celle du troisième lot témoin 0,300 ml.

c) *Toxine préparée à 37°*. La DL50 de la toxine du vibron Ogawa 144 (quatre heures à 37°) qui était égale à 0,200 ml pour les témoins, n'était plus que 0,095 ml pour les souris traitées par 10 mg/kg de chlorpromazine.

d) *Toxine préparée à 41°*. Les doses létales respectives pour les souris traitées par 20 mg/kg de chlorpromazine et les souris témoins sont 0,445 et 0,04 ml de toxine élaborée en quatre heures.

## II. — INFECTION PAR *V. cholerae*.

Les résultats de toutes les expériences d'infection figurent dans le tableau II.

a) *Cultures à 20°*. On inocule par voie péritonéale à 30 souris ayant reçu une heure avant 10 mg/kg de chlorpromazine par voie sous-cutanée et à 30 souris témoins, des vibriions Inaba 200 récoltés sur gélose peptonée après vingt-quatre heures à 20°. Les DL50 calculées après soixante-douze heures d'observation sont : lot traité =  $2,1 \times 10^9$ , lot témoin =  $4,0 \times 10^9$ .

b) *Cultures à 37°*. Une première expérience faite avec le vibron Ogawa 144, âgé de 5 heures, a donné les résultats suivants : DL50 des souris traitées par 10 mg/kg de chlorpromazine =  $4,0 \times 10^9$ , DL50 des témoins =  $9,5 \times 10^9$ .

Dans une deuxième expérience avec le vibron Inaba 200 dont la DL50 pour les témoins était de  $4,5 \times 10^9$ , trois lots ont été traités par la chlorpromazine : le premier a reçu 20 mg/kg une heure avant *V. cholerae*, il fournit une DL50 de  $0,85 \times 10^9$  ; le deuxième lot a reçu également 20 mg/kg mais en trois doses égales administrées une heure, trois heures et six heures après l'inoculation du vibron, sa DL50 est de  $2,5 \times 10^9$  ; enfin le troisième lot, traité au même horaire que le deuxième mais avec 5 mg/kg en trois doses, a une DL50 de  $2,0 \times 10^9$ .



Notre troisième expérience avec des vibrions (Inaba 200) cultivés à 37° comprenait trois lots de souris : 30 témoins, 30 ayant reçu 20 mg/kg de chlorpromazine, 30 auxquelles on avait administré en outre et simultanément 2 mg de cortisone. Les DL50 obtenues ont été respectivement :  $4,0 \times 10^9$ ,  $0,8 \times 10^9$  et  $4,0 \times 10^9$ .

TABLEAU II. — Action de la chlorpromazine (CPZ) sur l'infection de la souris par *V. cholerae*. Sauf indication contraire, la chlorpromazine et la cortisone ont été administrées une heure avant l'inoculation des vibrions.

N° EXPÉRIENCE SOUCHE	INCUBATION	TRAITEMENT	DL 50 % VIBRIONS $\times 10^9$	LIMITES DE CONFIANCE		RAPPORT DL50 TRAITÉS DL50 TÉMOINS
				INF.	SUP.	
n° 7 Inaba 200	24 h à 20°	néant CPZ 10 mg/k	4,0 2,1	8,5 1,3	6,4 3,3	0,52
n° 8 Ogawa 144	5 h à 37°	néant CPZ 4 mg/k	9,5 4,0	5,1 2,1	12,5 7,4	0,42
n° 9 Inaba 200	22 h à 37°	néant	4,5	3,3	6,0	0,44
		CPZ 5 mg/k (en 3 doses)	2,0	1,1	3,6	
		CPZ 20 mg/k (en 3 doses)	2,5	1,6	3,8	
n° 10 Inaba 200	22 h à 37°	CPZ 20 mg/k	0,85	0,5	1,6	0,18
		CPZ 20 mg/k	4,0	2,0	6,0	0,20
		CPZ 20 mg/k + cortisone 2 mg	0,8	0,4	1,6	
n° 11 Inaba 200	18 h à 41°	néant	4,0	2,0	6,0	1,0
		CPZ 10 mg/k	3,0	1,6	5,7	

c) Cultures à 41°. Une dose de chlorpromazine de 5 mg/kg administrée aux souris une heure avant les vibrions Inaba 200, cultivés dix-huit heures à 41°, ramène leur DL50 à  $3,0 \times 10^9$  contre  $6,0 \times 10^9$  pour celle des témoins.

#### DISCUSSION.

Comme l'indiquent les résultats de nos expériences, dans tous les cas, et contrairement à notre hypothèse de travail, la chlorpromazine s'est avérée aggravante, d'une façon plus ou moins

marquée mais toujours nette, pour l'intoxication et l'infection cholériques de la souris. Cette action se traduit par la diminution des volumes de toxine ou du nombre des vibrions mortels pour 50 p. 100 des animaux traités, relativement aux quantités correspondantes létales pour les témoins.

Nous devons, néanmoins, faire observer que l'examen des limites de confiance des DL50, qui figurent dans les tableaux I et II, montre que les différences entre les deux groupes, souris traitées et souris témoins, ne sont statistiquement significatives que dans quatre expériences seulement pour lesquelles le rapport DL50 traités/DL50 témoins sont les plus bas. Ces expériences (n<sup>os</sup> 4, 6, 9 et 10) diffèrent des autres par la dose de chlorpromazine (20 mg/kg en une fois) qui est la plus forte que nous ayons employée. Ceci peut suffire à expliquer la plus grande netteté de leurs résultats, due à une action plus énergique de la chlorpromazine, et peut, à notre avis, faire tenir pour démonstratif et valable l'ensemble de notre expérimentation.

Dans ces conditions, l'action aggravante de la chlorpromazine sur les souris recevant soit la toxine soit les vibrions cholériques, ne semble pas dépendre de la température d'incubation préalable des bactéries. La valeur du rapport  $\frac{\text{DL50 souris traitées}}{\text{DL50 souris témoins}}$  diminue

à mesure que la dose de chlorpromazine augmente, pour une même température d'incubation dans les deux groupes d'expériences. On peut donc considérer que, même si comme on peut le croire la température d'incubation modifie les proportions des facteurs toxiques constituant la toxine cholérique, les variations de la composition de celle-ci n'interviennent pas dans le mécanisme d'action de la chlorpromazine.

Nous devons donc envisager l'action aggravante de ce médicament sur le choléra expérimental de la souris comme particulière à cette intoxication. Dans un travail antérieur [12], nous avons démontré le rôle de la glande surrénale comme facteur de résistance à l'intoxication cholérique expérimentale, par l'abaissement très important de la DL50 de la toxine chez les souris surrénalectomisées. Nous avons constaté aussi que le traitement par la cortisone compensait largement la privation de surrénales. C'est pourquoi nous avons fait deux expériences (n<sup>os</sup> 4 et 10) en administrant simultanément à des souris la dose maxima de chlorpromazine (20 mg/kg) et la dose efficace de cortisone (2 mg) une heure avant la toxine ou les vibrions. Dans ces conditions la DL50 des souris ainsi traitées a été supérieure à la DL50 des témoins dans le cas de la toxine et sensiblement égale à cette dose dans le cas des vibrions. Ces résultats, joints à ceux fournis par les témoins « toxine + cortisone » et « vibrions + cortisone » (non figurés

aux tableaux), montrent que l'action protectrice de la cortisone, si elle est plus marquée sur les souris éprouvées par la toxine cholérique que sur les souris infectées par *V. cholerae*, compense toujours l'action aggravante de la chlorpromazine.

D'autre part, nous avons constaté que, parmi les souris qui succombent à l'épreuve de la toxine aussi bien que des vibrions cholériques, les animaux traités par la chlorpromazine seule mouraient plus tardivement que les témoins (vingt-quatre heures plus tard, en moyenne) et que les survivants même restaient en hypothermie et inertes parfois plus de soixante-douze heures, alors que les témoins rescapés semblaient en parfaite santé dès le deuxième jour. Il est donc vraisemblable que l'effet hypothermisant de la chlorpromazine se surajoutant à celui identique de la fraction protidique de la toxine [10], favorise la mort des animaux en prolongeant l'algidité cholérique.

Nous estimons donc que, dans le cas du choléra expérimental de la souris, les propriétés aggravantes de la chlorpromazine sont dues à : a) son action antisécrétoire qui s'exerce spécialement sur la sécrétion de la glande surrénale, et b) accessoirement, son action hypothermisante.

On sait que la thérapeutique symptomatique du choléra a fait souvent appel à l'adrénaline et au réchauffement pour combattre le collapsus et l'algidité ; l'expérimentation à laquelle nous avons procédé aboutit en somme à confirmer par des faits l'impression que l'on aurait pu avoir *a priori*, à savoir : qu'il ne serait pas indiqué de recourir dans cette maladie à un médicament qui en reproduit deux symptômes majeurs : l'hypotension et l'hypothermie.

#### CONCLUSIONS.

Deux groupes d'expériences ont été pratiqués sur la souris. Dans le premier, les animaux ont reçu des toxines cholériques préparées à 20°, 37° et 41°. Dans le second groupe ils ont été infectés par des *V. cholerae* cultivés aux mêmes températures. Dans chaque groupe des lots de souris ont été traités par la chlorpromazine administrée à des doses allant de 4 à 20 mg/kg, soit en une seule dose une heure avant la toxine ou les vibrions, soit répartie en trois doses dans les premières six heures de l'épreuve. Dans chacune des expériences les doses létales des souris traitées ont été inférieures à celle des témoins. L'action aggravante de la chlorpromazine est indépendante de la température de préparation de la toxine ou d'incubation des vibrions ; elle est proportionnelle à la dose de ce médicament lorsqu'il est administré avant l'épreuve. L'effet des doses fractionnées est moins marqué.

L'action aggravante de la chlorpromazine sur l'intoxication et



l'infection cholériques expérimentales de la souris, qui contraste avec son action généralement antagoniste sur les endotoxines et nulle sur les exotoxines d'autres bactéries, ne semble pas due à la constitution particulière de la toxine cholérique. Le fait que la cortisone, qui contrebalance largement la privation des surrénales chez les souris soumises à l'injection de toxine cholérique, s'oppose à l'action de la chlorpromazine, indique plutôt que cette aggravation est due aux propriétés, antisécrétoire pour la surrénale et hypothermisante, de la chlorpromazine qui exagèrent deux des symptômes majeurs de la maladie cholérique : le collapsus et l'hypothermie.

#### RÉSUMÉ.

La chlorpromazine a, sur l'intoxication et l'infection cholériques expérimentales de la souris, une action aggravante constante, indépendante de la constitution particulière de la toxine cholérique, qui semble due à deux des propriétés de ce médicament : antisécrétoire pour l'adrénaline et hypothermisante.

#### SUMMARY

##### ACTION OF CHLORPROMAZIN ON EXPERIMENTAL INTOXICATION AND INFECTION WITH CHOLERA TOXIN AND VIBRIOS IN MICE.

Chlorpromazin always increases the severity of experimental intoxication and infection in mice. This action does not depend on the composition of cholera toxin ; it seems to be due to two properties of the drug : an inhibitory activity against adrenalin secretion and a temperature depressing activity.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MARAL (R.). *VI<sup>e</sup> Congrès international Microbiologie*, Rome, 1953, **1**, 192.
- [2] REILLY (J.) et TOURNIER (P.). *Bull. Acad. Méd.*, 1953, **137**, 385.
- [3] CHEDID (L.) et BOYER (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 336.
- [4] ABERNATHY (R. S.) et HALBERG (F.). *J. Lab. clin. Med.*, 1955, **46**, 790.
- [5] NOYES (H. E.), SANFORD (J. P.) et NELSON (R. M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **92**, 117.
- [6] GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 123 et 1945, **71**, 83 et 321.
- [7] FRETER (R.). *J. inf. Dis.*, 1956, **99**, 207.
- [8] JENKIN (C. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1959, **21**, 191.
- [9] JUDE (A.) et GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 282.
- [10] GALLUT (J.) et JUDE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 282.
- [11] BONÉT-MAURY (P.), JUDE (A.) et SERVANT (P.). *Rev. Immunol.*, 1954, **48**, 21.
- [12] GALLUT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1414.

# ESSAIS DE DIFFÉRENCIATION DES MYCOBACTÉRIES SENSIBLES ET RÉSISTANTES A L'INH A L'AIDE DE TESTS QUANTITATIFS ET QUALITATIFS DE L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE.

## DISCUSSION DE QUESTIONS TECHNIQUES

par A. ANDREJEW, Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET (\*) (\*\*).

*(Institut Pasteur de Lille)*

En 1956, nous avons signalé pour la première fois que, contrairement aux bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, les bacilles résistants à l'INH ne possèdent qu'une activité peroxydasique très affaiblie ou nulle [1]. Cette différence, qui concerne aussi bien les bactéries intactes que leurs broyats [1, 2], a été observée à l'aide de la réaction colorimétrique basée sur l'oxydation peroxydasique des phénols.

L'emploi du procédé quantitatif de Willstätter et Stoll [3], modifié par Sumner et Gjessing [4], nous a permis de voir que, pour un même laps de temps, le pyrogallol subit une oxydation peroxydasique très nette en présence des bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, et nulle, ou beaucoup plus faible, avec les bactéries INH-résistantes. Dans le premier cas, en effet, les bactéries et la solution se colorent en orangé plus ou moins foncé, par suite de la formation de la purpurogalline (produit d'oxydation du pyrogallol); dans le second cas, par contre, la couleur des bactéries et de la solution correspondante, pour un même temps, ne varie pas ou presque pas. Dans les mêmes conditions, il n'y a pas de formation de purpurogalline avec les bactéries sensibles à l'INH préalablement chauffées à 100°. D'autre part, en présence des bacilles intacts sensibles à l'INH, la formation de la purpurogalline au taux mesuré n'a lieu qu'en présence de  $H_2O_2$  et n'est pratiquement pas influencée par le diéthylthiocarbamate

(\*) Manuscrit reçu le 8 juillet 1960.

(\*\*) Travail exécuté avec l'aide du C. N. R. S.

de  $\text{Na } 10^{-3} \text{ M}$ . Par conséquent, l'oxydation du pyrogallol est principalement due, dans ces conditions, à une activité peroxydasique et non à une activité polyphénol-oxydasique des bactéries.

L'expression « activité peroxydasique des *Mycobactéries* » signifie pour nous que ces bactéries oxydent le pyrogallol (phénol-donateur d'hydrogène) aux dépens de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dans nos conditions d'expériences.

Le problème étudié sous cet angle présente une unité plus physiologique que biochimique. Avec les bactéries intactes, nous étudions, en effet, l'oxydation des phénols, aux dépens de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indépendamment de la nature des facteurs impliqués : cette oxydation peut être produite par d'autres facteurs que la seule peroxydase.

Lorsque la réaction est extrêmement faible, comme dans le cas de certaines souches (*Mycobactéries* aviaires [5] ou atypiques [2], par exemple), cela ne signifie pas nécessairement que ces bactéries possèdent une peroxydase. D'autres dérivés hématiniques, tels que la catalase, les cytochromes ou même l'hématine libre, sont en effet également susceptibles de donner une telle réaction. On ne connaît, à l'heure actuelle, aucun inhibiteur susceptible d'inhiber sélectivement et totalement toutes ces sources secondaires possibles d'activité peroxydasique d'une cellule, sans nuire à la peroxydase. D'autre part [6] la peroxydase (« horse radish peroxidase » par exemple) en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxyde pratiquement tous les phénols, mais on ne connaît pas de phénol, ni d'autre donateur d'hydrogène, spécifique de cet enzyme.

L'activité peroxydasique des *Mycobactéries* sensibles à l'INH est généralement faible, et varie suivant les espèces. Par exemple, les bacilles tuberculeux humains possèdent, en général, une activité peroxydasique nettement plus élevée que les *Mycobactéries* atypiques. Cette observation concerne et les bactéries intactes et les différentes fractions de leurs broyats.

Le surnageant de broyat, débarrassé des bactéries par centrifugation à froid, possède une activité peroxydasique ; elle se retrouve surtout dans la fraction de ce surnageant, précipitée par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  entre 0,4 et 0,8 de saturation [4].

D'autre part, l'activité catalasique de cette fraction est plus fortement inhibée par l'azoture de  $\text{Na}$  ( $\text{N}_3\text{Na } 10^{-6} \text{ M}$ ), que son activité peroxydasique.

Chez les *Mycobactéries* atypiques l'activité catalasique est généralement plus forte et l'activité peroxydasique nettement plus faible que chez les bacilles tuberculeux humains ou bovins. Il est donc peu probable que la catalase seule puisse être responsable de l'activité peroxydasique dans les deux cas.

L'existence d'une peroxydase chez les bacilles tuberculeux peut



être admise pour les raisons exposées par ailleurs [1, 2] et une partie importante de l'activité mesurée peut être attribuée à cette enzyme. Seuls les bacilles tuberculeux résistants à l'INH, qui ne manifestent aucune activité peroxydasique, ni à l'état intact, ni après broyage suivi de dialyse, peuvent être considérés comme dépourvus de peroxydase.

Ajoutons que ni dans le cas des bacilles tuberculeux, ni dans celui de certaines souches de Mycobactéries atypiques « à croissance rapide », intactes ou broyées, l'oxydation peroxydasique du pyrogallol n'est affectée par l'éthanol [2]. Or, selon Keilin et Hartree [7], en présence de l'éthanol, la catalase exerce son action peroxydasique suivant le schéma :  $\text{éthanol} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{acétaldéhyde}$ . Si l'activité peroxydasique des Mycobactéries atypiques n'était exercée que par leur catalase, on pourrait s'attendre à ce qu'une partie au moins de cette activité soit déviée vers l'éthanol et que, par conséquent, l'oxydation peroxydasique du pyrogallol soit diminuée dans ces conditions. On sait, en effet, que la catalase ne décompose pas seulement  $\text{H}_2\text{O}_2$  (activité catalasique), mais est susceptible également d'oxyder, aux dépens de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , certains alcools, tels que le méthanol, l'éthanol, le *n*-propanol ou l'isobutanol (activité peroxydasique de la catalase), de préférence, semble-t-il, aux phénols (ou amines aromatiques), pour lesquels les peroxydases présentent plus d'affinité.

Ce fait apporte une indication supplémentaire en faveur de l'existence d'une peroxydase chez les bacilles tuberculeux.

## I. — ESSAIS DE DÉTERMINATIONS QUANTITATIVES.

On sait que l'oxydation peroxydasique d'un phénol est une succession de réactions, impliquant la formation du complexe enzyme-substrat :



et celle du produit de la réaction :



ou E = enzyme (peroxydase), S = substrat ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ES = complexe enzyme-substrat, AH = donateur d'hydrogène (gaïacol), P = produit de la réaction (polygaïacol),  $k_1$  = constante de vitesse de formation du complexe enzyme-substrat et  $k'_4$  = constante de vitesse de formation du produit de la réaction.

D'après Devlin [8], l'emploi du gaïacol permet une approxima-

tion correcte de  $k_1$  et de  $k'_4$ . Par contre, l'emploi du pyrogallol ne fournit pas, semble-t-il, une approximation tout à fait exacte de  $k'_4$ .

Cependant, le test spectrophotométrique au gaïacol [8], que nous avons employé lors de nos études de l'inhibition de la peroxydase purifiée du raifort par l'INH [2], se prête mal aux mesures de l'activité peroxydasique des suspensions bactériennes en général, et tout particulièrement de celles des *Mycobactéries*. Nous avons vu, en effet, que le produit d'oxydation du gaïacol (polygaïacol) est rapidement réduit (décoloré) par les bacilles tuberculeux [2]. Dans ces conditions, l'accumulation quantitative du polygaïacol n'est pas possible et ce procédé ne peut servir de base à des mesures quantitatives, spectrophotométriques ou chimiques, de l'activité peroxydasique de ces bactéries intactes.

D'une façon générale, on sait qu'à l'exception de la purpurogalline (produit d'oxydation de pyrogallol), presque tous les produits d'oxydation peroxydasique des autres phénols sont instables et se prêtent donc mal aux dosages chimiques [9]. C'est justement grâce à l'instabilité de ces produits que, par leur intermédiaire, la peroxydase est susceptible d'oxyder un très grand nombre d'autres substances et de jouer dans la cellule le rôle d'enzyme subsidiaire importante d'oxydation.

Avec les bactéries intactes nous avons généralement employé le pyrogallol comme donateur d'hydrogène. Contrairement à certains autres phénols (gaïacol ou catechol, par exemple), le pyrogallol, en présence de  $H_2O_2$ , est toujours plus ou moins oxydé par presque toutes les souches de *Mycobactéries* intactes, sensibles à l'INH, que nous avons étudiées. Dans les mêmes conditions d'expérience, la purpurogalline n'est pas, ou presque pas, formée en l'absence de  $H_2O_2$ . D'autre part, la purpurogalline reste stable en présence des *Mycobactéries* et, par conséquent, s'accumule et s'extrait quantitativement.

Afin de pouvoir, d'autre part, comparer l'activité peroxydasique des *Mycobactéries* à celle des autres bactéries ou même à celle de différents tissus d'organes, ou de leurs fractions, il était intéressant de l'exprimer en P. Z. (« Purpurogallin Zahl » de Willstätter), valeur quantitative universellement employée. Or, cette valeur correspond au nombre de milligrammes de purpurogalline formée à partir du pyrogallol, par milligramme d'une préparation enzymatique, dans les conditions du procédé que nous avons employé [4] (qui reste d'ailleurs l'un des meilleurs procédés dans ce domaine à l'heure actuelle).

Au cours de l'isolement classique de la peroxydase, on exprime en P. Z. l'activité des homogénats et de leurs différentes fractions,

indépendamment du fait qu'ils soient plus ou moins chargés d'impuretés, et notamment d'autres enzymes. Un P. Z. peu élevé, par exemple, indique que la fraction donnée est pauvre en activité peroxydasique et, par conséquent, riche en impuretés (substances autres que l'enzyme actif).

Il nous a donc paru possible d'exprimer en P. Z. l'activité des broyats bacillaires et de leurs différentes fractions [4], ainsi que celle des bactéries intactes. Dans le premier cas, le P. Z. correspond à 1 mg (poids sec) de surnageant de broyat ou d'une fraction du surnageant ; dans le second cas, à 1 mg. en poids sec, de bactéries.

L'expérience est conduite dans les conditions suivantes : On mélange 2 ml de pyrogallol (100 mg), 10 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH 6 et 1 ml de  $H_2O_2$  à 1 p. 100. (Nous employons le tampon phosphate à la concentration finale de 0,01 M, au lieu de 0,05 M employé par Sumner et Gjessing [4], pour réduire au minimum la possibilité d'inhibition de la réaction par les sels [10]). On ajoute de l'eau bidistillée pour que le volume total soit de 20 ml. Au temps 0 on introduit la peroxydase purifiée, ou les bactéries, ou leurs extraits. On agite le mélange, à 20°, pendant cinq minutes exactement et on ajoute 0,5 ml de  $SO_4H_2$  à 20 p. 100, afin d'arrêter la réaction. La purpurogalline formée est ensuite extraite quantitativement avec un volume connu d'éther. La solution éthérée est soigneusement séchée avec  $SO_4Na_2$  anhydre. On dose la purpurogalline à l'aide d'un électrophotomètre, à 430 m $\mu$ , en se référant à une solution titrée de ce produit.

Pour réduire au minimum l'auto-oxydation du pyrogallol au cours de la réaction, auto-oxydation qui est appréciable à pH 7-7,5 mais pratiquement nulle à pH 6, suivant les indications de Sumner et Gjessing [4], nous avons effectué nos expériences à ce dernier pH, bien que l'activité peroxydasique des Mycobactéries soit, semble-t-il, supérieure à pH 7,5 qu'à pH 6. Pour pouvoir exprimer les résultats en P. Z. il était d'ailleurs nécessaire de tenir compte de toutes les conditions de ce procédé [4], y compris le pH. Dans tous les cas, les témoins dépourvus de bactéries permettent de suivre l'éventuelle auto-oxydation du pyrogallol et, par conséquent, de corriger les résultats.

Lorsque l'activité peroxydasique est à peine perceptible dans ces conditions (Mycobactéries atypiques intactes, par exemple) nous prolongeons la réaction de quinze minutes, avec additions complémentaires de 0,5 ml de  $H_2O_2$  à 1 p. 100 toutes les cinq minutes (à cause d'une activité catalasique relativement forte de ces bactéries). Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en milligrammes de purpurogalline formée par un poids donné de bacté-



ries en vingt minutes. Néanmoins, lorsque, dans ces conditions, l'activité reste très faible, nous considérons les résultats obtenus comme peu significatifs.

Dans tous les cas, nous avons employé les bactéries mises en suspension à l'aide d'un homogénéiseur du type Potter-Elvehjem. Il est ainsi possible d'assurer un contact satisfaisant entre les bactéries et le mélange réactionnel et d'exprimer ensuite les résultats en fonction de leur poids sec.

Les broyats bacillaires sont obtenus en présence de la poudre de verre ou du sable dans les mortiers ou les agitateurs mécaniques, refroidis par la glace, et centrifugés à froid [1, 2].

Dans ces conditions, nous avons vu que l'activité peroxydasique, exprimée en P. Z., des broyats bacillaires est nettement supérieure à celle des bactéries intactes [1, 2]. Mesurée dans les conditions habituelles [4], l'activité peroxydasique très faible de certaines souches de Mycobactéries intactes peut devenir nette après broyage.

Par conséquent, les mesures effectuées sur des bactéries intactes ne semblent pas correspondre à leur activité peroxydasique totale et ne peuvent donc être considérées comme rigoureusement quantitatives, surtout lorsqu'on tient compte des interférences secondaires possibles de l'activité catalasique des bactéries et éventuellement d'autres facteurs.

Ayant pris, cependant, certaines précautions, notamment pour assurer une quantité suffisante de  $H_2O_2$  au cours de la réaction (malgré l'activité catalasique des bactéries) et ayant étudié et écarté la possibilité de certaines autres interférences secondaires [2], il nous a été possible d'obtenir, même avec les bactéries intactes, des valeurs quantitatives comparables (bien que relatives par rapport à l'activité peroxydasique globale des broyats bacillaires).

Effectuées dans les mêmes conditions expérimentales, ces mesures se sont montrées valables, puisqu'elles nous ont permis de voir que, contrairement aux bacilles sensibles, les bacilles tuberculeux résistants à l'INH (intacts ou broyés) ne possèdent pas, ou presque pas, d'activité peroxydasique, et c'est le point principal que nous nous proposons d'éclaircir dans cette partie de nos recherches.

Cette diminution, ou absence, de l'activité peroxydasique ne signifie nullement, cependant, qu'il y ait une accumulation obligatoire de  $H_2O_2$  chez les bactéries INH-résistantes, puisque, comme nous l'avons vu, ces bactéries sont susceptibles, dans certaines conditions, d'accumuler une certaine quantité de  $\alpha$ -céto-glutarate et de pyruvate qui, en s'oxydant, décomposent non enzymatiquement  $H_2O_2$ .

## II. — TESTS QUALITATIFS.

Puisque la réaction colorimétrique [3, 4], qui nous a servi de base pour les mesures quantitatives [1, 2] de l'activité peroxydasique, peut être obtenue en ballons avec des suspensions de bactéries dispersées, on pouvait penser qu'elle le serait aussi qualitativement avec des cultures en tubes de Löwenstein. Dans tous les cas, en effet, les bacilles tuberculeux sensibles à l'INH produisent, au niveau de leurs membranes, de la purpurogalline (peu soluble dans l'eau) et s'en trouvent automatiquement colorés. Ce changement de coloration se remarque aussi bien avec les suspensions bacillaires qu'avec les colonies en milieu solide (1).

Le principe d'un test qualitatif simple (applicable aux colonies bactériennes entières), basé sur l'oxydation peroxydasique colorimétrique d'un phénol, ou même d'un autre donateur d'hydrogène valable, est donc automatiquement inclus dans le procédé quantitatif plus rigoureux [3, 4] que nous avons employé [1, 2].

La couleur seule des bactéries se trouve modifiée suivant les différents donateurs d'hydrogène, à condition, bien entendu, que ces donateurs présentent, à l'égard de ces bactéries, les mêmes caractéristiques de sensibilité, et leurs produits d'oxydation, les mêmes caractéristiques de stabilité.

Cependant, même avec un donateur d'hydrogène valable, un tel test ne peut se substituer entièrement aux mesures quantitatives. Il est à craindre, en effet, qu'au cas où l'activité peroxydasique serait simplement affaiblie (et non abolie), chez les bactéries faiblement résistantes à l'INH par exemple, un tel test (strictement qualitatif) ne soit positif, au même titre, ou presque, que celui des bacilles sensibles.

En employant un phénol (catechol) à la place d'un autre (pyrogallol), après une série d'examens exclusivement qualitatifs, appliqués aux seuls bacilles intacts. Tirunarayanan et Vischer ont confirmé [11] notre observation concernant la différence d'activité peroxydasique entre les bacilles tuberculeux sensibles et les bacilles tuberculeux résistants à l'INH [4], et l'ont exprimée, respectivement par « peroxydase + », ou « peroxydase — ». Cependant, ces auteurs n'ont pas étudié les possibilités d'interférences secondaires de cette réaction avec la cathechol-oxydase, avec l'activité peroxydasique de la catalase, ou avec les autres facteurs héminiques (cytochromes) des Mycobactéries.

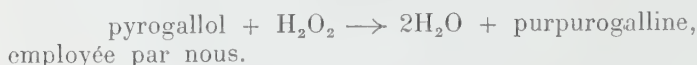
Vischer, Tirunarayanan et Bruhin ont décrit ensuite une « nouvelle méthode chimique pour distinguer rapidement les bacilles

(1) Lors des déterminations quantitatives [1, 2], la purpurogalline formée est d'ailleurs extraite à l'éther aussi bien à partir des corps bacillaires ainsi enrobés, qu'à partir de la solution.

tuberculeux INH-sensibles des bacilles tuberculeux INH-résistants » [12], selon les mêmes critères. Cette méthode est basée sur la réaction colorimétrique classique de l'oxydation peroxydasique des phénols, suivant le schéma :



au lieu de la réaction (globale) :



Les souches de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH se colorent en brun-noir dans le premier cas et en brun dans le second cas, qu'il s'agisse de cultures sur milieu de Löwenstein ou de suspensions homogènes.

Comme nous l'avons signalé plus haut, on ne connaît pas à l'heure actuelle de phénol, ni d'autre donateur d'hydrogène, spécifique de la peroxydase. Le catechol, par exemple, subit, surtout à pH acide, une très forte oxydation peroxydasique en présence du cytochrome c purifié et en l'absence de toute peroxydase. Bien que plus faiblement, le catechol est également oxydé par  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de la catalase purifiée et en l'absence de la peroxydase.

D'autre part, nous avons constaté que, dans les conditions du test de Vischer et coll. (vingt-quatre heures, milieu acide), les colonies de bacilles tuberculeux, comme celles des Mycobactéries atypiques, ne changent pas de couleur en présence du catechol et en l'absence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les bacilles intacts ne manifestent donc, dans ces conditions, aucune activité polyphénol (catechol)-oxydasique. Cette activité, qui existe chez ces bactéries ainsi que nous le montrerons plus loin, échappe totalement au test de Vischer et coll. [12]. Même dans le tampon phosphate 0,03 M pH 7, les Mycobactéries atypiques intacts (souche photo-chromogène, M. War) ne donnent lieu à aucune oxydation du catechol, appréciable au moyen de l'appareil de Warburg, en cent cinquante minutes à 37°.

Les résultats sont différents si on opère avec des bacilles broyés. Après broyage et centrifugation à froid des bactéries, nous obtenons un surnageant que nous traitons par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . Le précipité, obtenu entre 0,35 et 0,8 de saturation, est redissous et dialysé. L'étude de cette fraction d'extrait bacillaire démontre chez ces bactéries, l'existence d'une assez forte activité catecho-oxydasique. Ainsi, une activité qui paraissait totalement absente chez les bactéries intacts devient très nette après broyage de ces mêmes bactéries. Contrairement aux résultats de Tirunarayanan et Vischer, suivant lesquels les Mycobactéries atypiques n'oxydent pas le catechol [11], nous voyons donc qu'en réalité ces bactéries



possèdent un système enzymatique susceptible d'oxyder le catechol, même en l'absence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , c'est-à-dire indépendamment de toute activité peroxydasique. Ce système est d'ailleurs sensible au diéthylthiocarbamate de Na  $10^{-3}$  M, ainsi qu'à l'azoture de Na  $10^{-3}$  M et il est détruit par le chauffage de trente minutes à  $100^\circ$ .

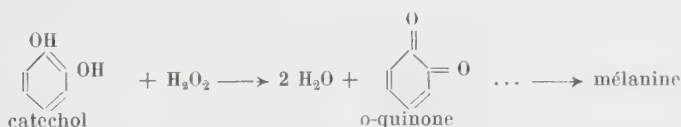
En présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de catechol, la réaction colorimétrique produite par la même fraction bacillaire (non chauffée) est nettement plus rapide et plus intense que sans  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En plus de l'action catechol-oxydasique, cette fraction bacillaire semble donc manifester également une activité peroxydasique à l'égard du catechol.

Il est donc probable que la pénétration du catechol dans les Mycobactéries intactes est plus ou moins déficiente, en ce qui concerne leur système polyphénol-oxydasique.

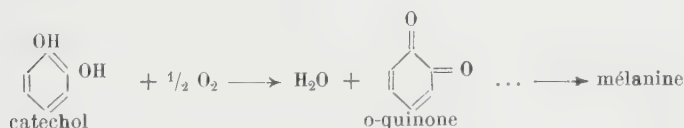
Signalons également que les broyats de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH manifestent une certaine activité polyphénol-oxydasique, tandis que ceux des souches INH-résistantes, que nous avons étudiées, en sont pratiquement dépourvus.

Rappelons que dans les deux cas (activité catechol-oxydasique et activité peroxydasique), l'oxydation d'un même donateur d'hydrogène, tel que le catechol, fournit un même produit terminal, suivant les schémas [9].

Activité peroxydasique :



Activité catechol-oxydasique :



L'o-quinone est un produit instable et subit une série de réactions dont les vitesses sont difficilement contrôlables au cours d'un test appliqué aux milieux de cultures entiers.

L'o-quinone est, en effet, hydrolysée d'abord en hydroxyhydroquinone qui, par réaction avec l'o-quinone, restitue le catechol et donne en outre l'hydroxyquinone. Ce dernier produit aboutit enfin, par une voie non enzymatique, à la formation d'un pigment brun noir, la mélanine, qui communique aux bactéries leur coloration foncée (que certaines souches atténuent, d'ailleurs, à la

longue). Dans certains cas, cependant, lorsque la cellule possède un agent réducteur adéquat, le polyphénol (catechol) peut être alternativement oxydé en quinone et réduit en polyphénol, sans que la réaction atteigne le stade de formation de la mélanine. Le polyphénol peut agir alors en tant que transporteur d'électrons vers  $O_2$  (en présence de la catechol-oxydase et de l'acide ascorbique réduit, par exemple [13]).

En remplaçant le catechol par le pyrogallol ou la benzidine, nous évitons cette longue série de réactions secondaires qui précède la formation de la mélanine. Ces substances ne sont, cependant, pas plus spécifiques de la peroxydase que le catechol, même si le pyrogallol, par exemple, semble être oxydé un peu moins fortement que le catechol par  $H_2O_2$  en présence du cytochrome *c* en milieu acide, et, comme la benzidine, un peu plus fortement en présence de la catalase. Le catechol est oxydé légèrement même par l'oxydase de l'acide ascorbique, qui n'oxyde cependant pas le pyrogallol.

D'une façon générale, il n'existe pas, à l'heure actuelle de bonne méthode chimique de recherches des peroxydases. Il existe, cependant, quelques méthodes d'appréciation de l'activité peroxydasique. Parmi les meilleurs procédés, applicables notamment aux bactéries entières, le procédé au pyrogallol (mesures quantitatives) et le procédé à la benzidine (recherche qualitative) sont les plus couramment employés et semblent donner les meilleurs résultats ; le procédé au gaïacol, excellent dans certains cas, est, ainsi que nous l'avons vu plus haut, inapplicable à l'étude des *Mycobactéries* intactes.

L'activité peroxydasique des *Mycobactéries* intactes est-elle reflétée avec la même sensibilité par les tests au pyrogallol, à la benzidine ou au catechol ?

On sait que la pénétration des différents phénols vers les centres actifs des enzymes des bactéries intactes peut varier. Même si l'activité peroxydasique de ces bactéries intactes n'est due qu'à la peroxydase seule, l'affinité de cet enzyme à l'égard des différents phénols peut également varier. Par exemple, la cytochrome *c*-peroxydase [10] a une très faible affinité pour le pyrogallol ( $P. Z. = 0,9$ ), tandis que la peroxydase cristallisée du raifort [14] oxyde très fortement ce même phénol ( $P. Z. = 900$ ).

Or, nous ignorons totalement les caractéristiques de la peroxydase des bacilles tuberculeux, qui n'a jamais été ni cristallisée, ni même purifiée.

Afin d'envisager un test *qualitatif*, il a donc paru nécessaire de comparer tout d'abord l'efficacité de différents donateurs d'hydrogène dans différentes conditions d'expérience.

Parmi les donateurs d'hydrogène essayés (pyrogallol, benzidine, *p*-phenylènediamine, catechol, etc.), le catechol (employé dans les strictes conditions du test de Vischer et coll. [12]) s'est révélé le moins satisfaisant. Toutes les souches de Mycobactéries atypiques étudiées, et même de très nombreuses colonies de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, donnent, à la fois, un test au catechol totalement négatif et des tests à la benzidine ou au pyrogallol fortement positifs. Dans les mêmes conditions, tous ces tests restent négatifs en l'absence de  $H_2O_2$ , ainsi qu'avec des bactéries chauffées.

Pour la mise en évidence de l'activité peroxydasique chez les Mycobactéries, les tests à la benzidine ou au pyrogallol que nous avons employés se révèlent infiniment plus sensibles que le test de Vischer et coll. [12].

Celui-ci ne permet pas, en cas de mélanges, de distinguer les Mycobactéries atypiques des bacilles tuberculeux résistants à l'INH, puisque ce test est négatif dans les deux cas. De même, un grand nombre (allant jusqu'à 40 p. 100) de colonies, isolées et surtout agglomérées, de certaines souches de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ), peuvent être confondues avec des colonies résistantes à l'INH, puisque, comme nous l'avons vu, ce test peut être négatif dans les deux cas.

Par contre, le test à la benzidine permet d'écarter ces inconvénients et de mieux distinguer les colonies de bacilles tuberculeux assez fortement résistants à l'INH (test négatif), même en présence des Mycobactéries atypiques : ces dernières donnent un test à la benzidine positif, comme d'ailleurs toutes les colonies étudiées, isolées ou agglomérées, de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, pourvus d'activité peroxydasique.

Par ailleurs, le test au catechol n'est interprétable qu'après un délai d'environ vingt-quatre heures.

Le test à la benzidine colore, au contraire, en quelques minutes, les colonies de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, en bleu foncé. De même, le test au pyrogallol, qui est de sensibilité équivalente, colore ces bactéries en brun. Pour un test qualitatif de ce genre, la benzidine paraît donc préférable au pyrogallol, puisque le bleu-noir contraste mieux que le brun avec la couleur plus ou moins inchangée des colonies INH-résistantes de bacilles tuberculeux.

Enfin, nous avons constaté qu'il est possible de récupérer, par repiquage, les colonies, en vue de leur étude ultérieure, après un test de deux à cinq minutes (benzidine).

Quelles sont les conditions respectives d'application des tests au catechol [12] et à la benzidine ?

Le test de Vischer et coll. [12] consiste à mélanger 10 parties

de tampon acétate 0,2 M, pH 4, avec 2 parties d'une solution aqueuse de catechol (pyrocatechine) à 2 p. 100 et 1 partie de  $H_2O_2$  au 1/100. On recouvre la surface du milieu de culture avec ce mélange et on constate que les nombreuses colonies de bacilles tuberculeux sensibles à INH changent progressivement de couleur pour devenir presque noires après vingt-quatre heures environ.

Les conditions de ce test sont-elles favorables à l'activité de la peroxydase ?

Les essais effectués avec la peroxydase purifiée du raifort (« horse radish peroxidase ») montrent que l'activité de cette enzyme est inhibée de 80 à 90 p. 100 dans le tampon acétate 0,2 M, pH 4, en cinq minutes, par rapport au tampon phosphate 0,01 M, pH 6 (que nous employons habituellement lors des mesures quantitatives de l'activité peroxydasique des bactéries). En outre, la concentration de  $H_2O_2$  dans le test de Vischer et coll. [12] se révèle trop forte et inhibe, à elle seule, l'activité de la peroxydase purifiée de 20 p. 100 environ. Dans les conditions de ce test, la peroxydase purifiée, et la catalase purifiée, sont d'ailleurs très rapidement coagulées et complètement inactivées.

La quantité de  $H_2O_2$  employée par ces auteurs serait largement suffisante (et ne pourrait même être dépassée) s'il s'agissait de mesurer, dans des conditions optima et au cours d'un test de cinq minutes, l'activité d'une peroxydase isolée et purifiée. Cependant, même avec la peroxydase purifiée, plusieurs additions supplémentaires de petites quantités de  $H_2O_2$  seraient nécessaires si l'activité peroxydasique devait s'étendre sur quelques heures, comme dans le cas de la préparation peroxydasique de la purpurogalline, par exemple. En effet, on ne peut employer d'emblée une grosse quantité de  $H_2O_2$ , puisqu'une concentration finale de  $H_2O_2$  supérieure à 1 p. 2 000, inhibe la peroxydase purifiée (d'une façon réversible).

A la surface des colonies de bacilles sensibles à l'INH la situation est, bien entendu, différente. Dans le cas des Mycobactéries intactes, la pénétration de  $H_2O_2$  vers l'enzyme est plus ou moins déficiente. Une partie plus ou moins importante de  $H_2O_2$  se trouve, d'autre part, rapidement décomposée, à la suite de l'activité catalasique de ces bactéries, surtout lorsque leurs colonies sont nombreuses. La catalase bacillaire qui n'est pas détruite instantanément dans ces conditions (pH acide, bacilles intacts), abaisse la concentration de  $H_2O_2$  à la surface des bactéries, tout au moins au cours du bref laps de temps que dure notre test (deux à cinq minutes, pour le test à la benzidine). Comme le montre l'expérience, on peut employer  $H_2O_2$  en grand excès sans inhiber l'activité peroxydasique des colonies entières de Mycobactéries. Au contraire, lors des essais des tests qualitatifs au pyrogallol et à



la benzidine, nous avons remarqué qu'avec des concentrations plus élevées de  $H_2O_2$  (voir le test à la benzidine), les résultats obtenus avec les colonies entières des Mycobactéries sont plus rapides et plus sûrs.

On sait d'ailleurs qu'un mélange des deux enzymes (catalase et peroxydase) donne lieu à l'action conjuguée suivante : la catalase peut détruire rapidement l'excès nuisible de  $H_2O_2$  et la peroxydase, inhibée réversiblement, redevient aussitôt active.

Il est possible que le contact entre les enzymes en jeu,  $H_2O_2$  et les donateurs d'hydrogène, se trouve également favorisé dans ces conditions.

Lorsqu'on augmente la proportion de  $H_2O_2$ , dans nos conditions d'expériences (voir plus loin le test à la benzidine), le catechol donne également des résultats nettement meilleurs que dans les conditions du test de Vischer et coll. [42] : de nombreuses colonies de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, ainsi que les Mycobactéries atypiques, qui donnent régulièrement un test de Vischer et coll. tout à fait négatif (activité peroxydasique nulle), oxydent nettement le catechol et se colorent (activité peroxydasique nette). La production de la mélanine à partir de o-quinone (catechol oxydé) n'est cependant pas complète d'emblée : les bactéries prennent d'abord une teinte violacée qui s'intensifie progressivement ; le contraste avec les colonies résistantes est cependant beaucoup moins net que dans le cas d'un test à la benzidine.

La négativité de la réaction au catechol, à pH 4 et en vingt-quatre heures, dans le cas des Mycobactéries atypiques (2) ne signifie pas que ce test soit spécifique : il suffit en effet d'augmenter la concentration de  $H_2O_2$  pour que, avec les mêmes souches de Mycobactéries atypiques, le test au catechol négatif devienne positif. Or, on ne peut mettre en doute la nature peroxydasique et enzymatique de cette réaction, puisqu'elle n'a lieu ni en l'absence de  $H_2O_2$ , ni avec les bactéries préalablement chauffées.

#### TEST A LA BENZIDINE.

Les résultats les plus rapides et les plus nets sont obtenus dans les conditions suivantes : on prépare une solution de benzidine à 1 p. 100 dans l'acide acétique normal (10 ml d'acide acétique pur + 163 ml d'eau). On agite cette solution et on filtre. On prépare extemporanément une solution de  $H_2O_2$  à 1 p. 100 (0,5 ml de  $H_2O_2$  à 110 vol., soit 30 p. 100 + 14,5 ml d'eau). Au dernier moment, on mélange ces deux solutions (benzidine et  $H_2O_2$ ), à

(2) L'activité catalasique de ces germes est souvent très forte et reste appréciable dans les conditions du test au catechol (pH 4, en vingt-quatre heures).

parties égales, et on verse ensuite ce mélange sur le milieu de culture et en quantité suffisante pour recouvrir complètement toutes les colonies. Il est préférable de ne pas mélanger ces solutions sur le milieu même, afin de ne pas favoriser le décollement des colonies. La durée du test est de deux à quinze minutes. Au-delà de cette limite, les bacilles tuberculeux INH-résistants prennent parfois une teinte grise ou faiblement bleutée (ou, à la longue, la couleur verte du milieu de Löwenstein), qui diminue le contraste avec le bleu foncé des bacilles tuberculeux sensibles à l'INH. (Comme nous l'avons vu précédemment [45] les bacilles résistants à l'INH possèdent les cytochromes des types *a*, *b* et *c*, qui pourraient, éventuellement, exercer une certaine activité peroxydasique, tout au moins à la longue).

Lorsque l'activité catalasique des souches est relativement forte, on peut même employer une solution d'eau oxygénée à 30 vol. (5,5 ml de  $H_2O_2$  à 110 vol. + 14,5 ml d'eau), à la place de  $H_2O_2$  à 1 p. 100. Le milieu de Löwenstein jaunit alors plus rapidement et perd la couleur vert-bleu que l'on obtient en milieu acide.

Les colonies de bacilles tuberculeux sensibles à l'INH restent fortement colorées, même après vingt-quatre heures.

La mousse, qui apparaît du fait de leur activité catalasique, est plus abondante avec  $H_2O_2$  à 30 vol. Cette mousse se dissipe assez rapidement, lorsqu'on redresse le tube de culture et la couleur des colonies apparaît alors avec plus de netteté. Après les premières minutes de contact, il est préférable de débarrasser le milieu du réactif, en l'aspirant à la pipette. On peut, en outre, agir isolément sur une colonie en l'encerclant au préalable au moyen d'un petit tube de verre piqué dans le milieu.

Certaines souches (aviaires ou bovines, par exemple), possèdent une activité catalasique extrêmement faible. Dans ces conditions, il est nécessaire d'employer, pour ce test, l'eau oxygénée à 1 p. 100 ou à 0,5 p. 100 (et non  $H_2O_2$  à 30 vol.).

Les *bacilles tuberculeux humains* sensibles à l'INH donnent généralement un test à la benzidine positif (colonies colorées en bleu foncé). Ce fut le cas pour 196 souches sur 200 étudiées. Quatre souches, cultivées sur milieu sans INH, ont donné un test à la benzidine douteux. Le vieillissement des cultures est peut-être la cause de cette négativité. Après repiquage ces cultures donnent un test positif.

Les *bacilles tuberculeux bovins*, cultivés sur milieu de Löwenstein dépourvu de glycérol (Ravenel ou BCG par exemple) se comportent comme les bacilles tuberculeux humains. Toutefois, la réaction est plus lente et moins nette pour les cultures en nappe (petites colonies intégrées au milieu) que pour les colonies isolées.

Les *bacilles tuberculeux, humains ou bovins, assez fortement*

*résistants à l'INH* (5 ou 10  $\mu\text{g/ml}$ ) donnent, en général, un test à la benzidine négatif. Les colonies restent de couleur claire, exceptionnellement plus ou moins bleutée, sans toutefois atteindre le bleu foncé caractéristique du test positif.

Les *bacilles tuberculeux, humains et bovins, faiblement résistants*

TABLEAU I. — Recherche qualitative de l'activité peroxydasique de 114 souches de Mycobactéries à l'aide des tests à la benzidine, au pyrogallol et au catechol [12].

Mycobactéries étudiées	Benzidine	Pyrogallol	Catechol (Vischer et coll. (12))
Bacilles tuberculeux humains sensibles à l'INH (36 souches)	35 souches + 1 souche + —	36 souches +	30 souches + 6 souches avec 30 à 40 % de colonies + ou —
Bacilles tuberculeux humains faiblement résistants à l'INH (0,05 à 0,5 $\mu\text{g}$ par ml) (25 souches)	20 souches + 5 souches —	19 souches + 3 souches + 3 souches —	14 souches + 4 souches + 7 souches —
Bacilles tuberculeux humains fortement résistants à l'INH (5 à 10 $\mu\text{g}$ par ml) (24 souches)	24 souches —	24 souches —	24 souches —
Mycobactéries aviaires natu- rellement résistants à l'INH (10 souches)	9 souches + 1 souche + —		10 souches —
Mycobactéries atypiques de différents types (groupes I, II, III, IV) sensibles ou naturelle- ment résistants à de faibles concentrations d'INH (24 souches)	22 souches + 2 souches + —	18 souches + 4 souches + 2 souches —	24 souches —
Mycobactéries atypiques "à croissance rapide" rendues fortement résistants à l'INH* (3.000 $\gamma\text{g}$ par ml) (3 souches)	2 souches + 1 souche + —	2 souches + 1 souche + —	3 souches —

\* Résistance obtenue par passages successifs sur l'INH.

à l'INH ( $< 5 \mu\text{g/ml}$ ) peuvent, en présence de la benzidine et de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , rester incolores, se colorer en bleu-gris et même donner un test franchement positif.

Les *bacilles aviaires*, naturellement résistants à l'INH, donnent, en général, un test à la benzidine positif.

Les *Mycobactéries atypiques* des différents groupes (I, II, III, IV), sensibles ou naturellement résistantes à de faibles concentrations d'INH, donnent, en dix à quinze minutes, un test à la benzidine positif. Par contre, ce test est négatif avec les six souches étudiées de *Mycobactéries atypiques* non photochromogènes fortement résistantes à l'INH (100 µg/ml).

Les *Mycobactéries atypiques* « à croissance rapide », fortement résistantes à l'INH (par exemple, *M. smegmatis* résistant à 3 000 µg d'INH/ml) qui conservent leurs cytochromes et une activité catalasique assez forte, bien qu'affaiblie par rapport à la souche-témoin, donnent un test positif, quoique légèrement ralenti dans certains cas.

Le tableau I résume les résultats comparatifs obtenus avec les tests à la benzidine, au pyrogallol et au catechol [12].

A l'exception des bacilles tuberculeux bovins, toutes les *Mycobactéries* ont été cultivées et entraînées sur milieu de Löwenstein ordinaire (contenant 0,75 p. 100 de glycérol), additionné ou non d'INH.

Le *n*-phénylènediamine (PPD) donne également, en présence de  $H_2O_2$ , un test rapide et les bacilles sensibles se colorent en bleu-noir. Cependant, la solution même de PPD s'oxyde assez vite et gêne ainsi l'observation.

Le test à la benzidine apparaît donc être l'un des plus sensibles, des plus rapides et des plus pratiques, pour l'appréciation qualitative de l'activité peroxydasique des colonies entières de *Mycobactéries*. L'étude du rapport exact entre l'activité peroxydasique des *Mycobactéries* intactes, décelée par ce test, et leur résistance à l'INH, est en cours et fera l'objet d'une autre publication.

#### RÉSUMÉ.

La recherche de l'activité peroxydasique permet la différenciation des bacilles tuberculeux sensibles et résistants à l'INH, ainsi que l'ont montré les auteurs dès 1956. Ceux-ci l'ont étendue, dans ce travail, à d'autres *Mycobactéries atypiques*.

Les conditions techniques de recherche de cette activité enzymatique, les méthodes de sa détermination quantitative, la critique des tests qualitatifs sont successivement envisagées.

Un test à la benzidine est décrit de façon détaillée. Il permet de différencier les *Mycobactéries tuberculeuses* sensibles à l'INH, les bacilles aviaires et les *Mycobactéries atypiques* (test positif), des bacilles tuberculeux ayant acquis une nette résistance au contact de l'INH (test négatif). Cette méthode se prête facilement au repiquage ultérieur des colonies.

Le test à la benzidine, très simple, est beaucoup plus rapide



que le test au catechol. Ce dernier est négatif avec les Mycobactéries atypiques, les bacilles aviaires, ainsi qu'avec les bacilles tuberculeux humains et bovins résistants à l'INH.

Nos recherches montrent, par ailleurs, que les bacilles tuberculeux humains et bovins, résistants à l'INH, ne possèdent qu'une activité polyphénol-oxydasique nulle ou fortement affaiblie, par rapport aux souches-témoins sensibles à l'INH.

## SUMMARY.

ATTEMPTS TO DIFFERENTIATE INH-SENSITIVE AND INH-RESISTANT MYCOBACTERIA BY MEANS OF QUANTITATIVE AND QUALITATIVE TESTS OF PEROXIDASE ACTIVITY.

## TECHNICAL DISCUSSION.

The determination of peroxidase activity allows to differentiate INH-sensitive and INH-resistant t. b., as the authors already showed in 1956. In the present paper, they also study atypical Mycobacteria.

They successively review the techniques of the demonstration of this activity, the methods of its quantitative determination, the critical studies of the qualitative tests.

They describe in details a benzidin test permitting to differentiate INH-sensitive t. b., avian t. b. and atypical Mycobacteria (positive reaction) from INH-resistant t. b. (negative reaction). This method easily applies to subcultures.

The benzidin test is very simple and much more rapid than the catechol test. The latter is negative with atypical Mycobacteria, avian t. b., and with human and bovine INH-resistant t. b.

Moreover the findings show that humane and bovine INH-resistant t. b. have no polyphenol-oxidase activity, or a much lower one than INH-resistant t. b.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 586.
- [2] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 145.
- [3] WILLSTATTER (R.) et STOLL (A.). *Untersuchungen über Enzyme*, 1928, **1**, 414.
- [4] SUMNER (J. B.) et GJESSING (E. C.). *Arch. Biochem.*, 1943, **2**, 291.
- [5] ANDREJEW (A.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **10**, 37.
- [6] ELLIOTT (K. A. C.). *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1281.
- [7] KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Biochem. J.*, 1945, **39**, 293.

- [8] DEVLIN (T. M.), in CHANCE (B.) et MAEHLY (A. C.) *Methods in enzymology*, **2**, 770. Acad. Press., New York, 1955.
  - [9] SUMNER (J. B.) et SOMERS (G. F.). *Chemistry and methods of enzymes*. Acad. Press., New York, 1953.
  - [10] ALTSCHUL (A. M.), ABRAMS (R.) et HOGNESS (T. R.). *J. biol. Chem.*, 1940, **136**, 777.
  - [11] TIRUNARAYANAN (M. O.) et VISCHER (W. A.). *Amer. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 62.
  - [12] VISCHER (W. A.), TIRUNARAYANAN (M. O.) et BRUHIN (H.). *Schweiz. Z. allg. Path.*, 1959, **22**, 577.
  - [13] ROBINSON (E. S.) et NELSON (J. M.). *Arch. Biochem.*, 1944, **4**, 111.
  - [14] THEORELL (H.). *Enzymologia*, 1942, **10**, 250.
  - [15] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 281.
-

**INTERFÉRENCE D'UN INHIBITEUR  
AU COURS DU DÉVELOPPEMENT  
DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (VIRUS SENDAI)  
EN ŒUF DE POULE EMBRYONNÉ.**

par L. COLOBERT et R. FONTANGES (\*)

(avec la collaboration technique de N. KRATCHKO)

*(Laboratoire de Bactériologie  
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes  
des Services de Santé des Armées, 108, bd Pinel, Lyon)*

Lorsque l'inoculation du virus Sendaï est pratiquée après le dixième jour, le titre hémagglutinant et le titre hémolytique des liquides embryonnaires récoltés deux jours plus tard se trouvent considérablement diminués et parfois même deviennent nuls. Ayant entrepris de rechercher les raisons de ce phénomène, nous avons trouvé qu'il est dû à l'interférence d'un inhibiteur non spécifique qui apparaît brusquement dans les liquides embryonnaires au onzième ou douzième jour d'incubation.

TECHNIQUES.

**LE VIRUS.** — La souche de virus Sendaï (1) utilisée est entretenue sur embryons de poulet. L'inoculation dans la cavité allantoïque de 0,1 cm<sup>3</sup> d'une dilution 10<sup>-4</sup> d'un liquide allantoïque infecté titrant de 320 à 2 560 unités hémagglutinantes Hirst permet de recueillir après deux jours d'incubation à 35° des liquides allantoïques présentant un titre hémagglutinant de cet ordre de grandeur. Ces liquides allantoïques infectés possèdent une activité hémolytique pour les hématies de diverses espèces animales et

(\*) Manuscrit reçu le 1<sup>er</sup> juillet 1960.

(1) Ce *Myxovirus* a encore été appelé virus D de la grippe [9] et également *Myxovirus parainfluenzae* I [4].



notamment pour les hématies humaines. Dans une note préliminaire [4], nous avons montré qu'il existe habituellement un parallélisme rigoureux entre le titre hémagglutinant et le titre hémolytique et nous avons supposé que l'hémolyse ne traduisait pas

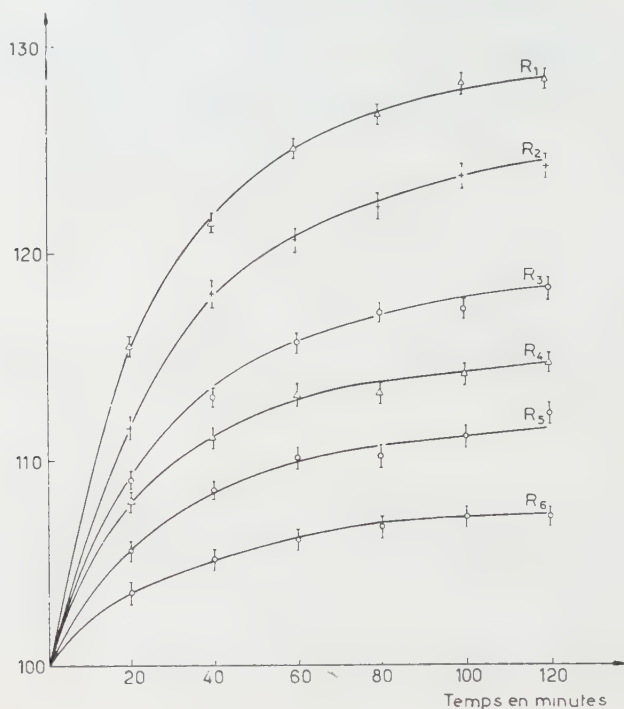


FIG. 1. — Cinétique de l'hémolyse exprimée en unités proportionnelles à la densité optique à  $580\text{ m}\mu$  du surnageant après centrifugation du milieu réactionnel, en fonction de la concentration en virus  $R_1, R_2, \dots R_6$  respectivement de 5,12, 2,56, 1,92, 1,26 et 0,64 unités Hirst.

autre chose que l'altération de la surface des hématies par l'enzyme du virus.

**TITRAGE DU POUVOIR HÉMOLYTIQUE.** — La figure 1 objective la cinétique de l'hémolyse à  $37^\circ$  lorsqu'on emploie du liquide allantoïque comme source de virus. Cette cinétique est tout à fait analogue à celle provoquée par les lysolécithines [3]. Les courbes représentatives sont des exponentielles qu'il est facile de transformer en droites en exprimant la quantité  $Q$  d'hémoglobine libérée en fonction du logarithme du temps  $t$  (fig. 2).

Pour toute concentration  $C_1$  en liquides allantoïques infectés, on peut donc écrire :

$$k_1 = \frac{Q}{\log_{10} t} \quad (2)$$

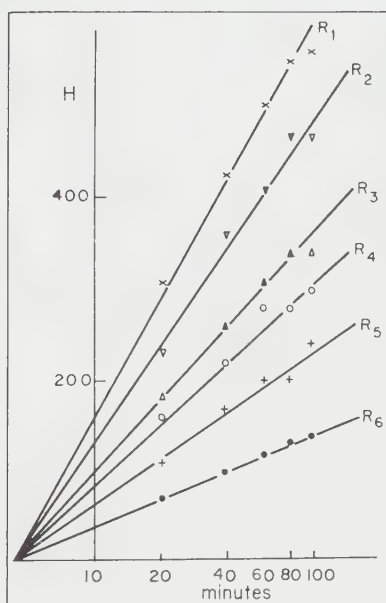


FIG. 2. — Activité hémolytique  $H$  exprimée en unités conventionnelles, en fonction d'un logarithme du temps d'incubation à  $37^{\circ}$  pour ces concentrations  $R_1, R_2, \dots, R_6$ , respectivement de 5,12, 3,84, 2,56, 1,92, 1,28, 0,64 unités hémagglutinantes Hirst de virus.

il suffit évidemment donc d'une seule mesure pour déterminer  $k_1$ , puisque la droite représentative passe par l'origine. Or, l'expérience montre que les constantes  $k_1, k_2, k_3, \dots, k_n$  correspondant à des concentrations  $C_1, C_2, C_3, \dots, C_n$  de liquide allantoïque, sont directement proportionnelles à celles-ci (fig. 3). On peut donc écrire si  $a$  est une constante :

$$C = a k = \frac{a}{\log_{10} t} Q$$

(2) Une erreur s'est glissée dans l'écriture de cette équation dans la note précédemment publiée [4].

en posant  $\frac{a}{\log_{10} t} = 1$  pour un temps  $t_1$  arbitrairement choisi, on a  $Q = C$ , c'est-à-dire la quantité d'hémoglobine libérée au bout

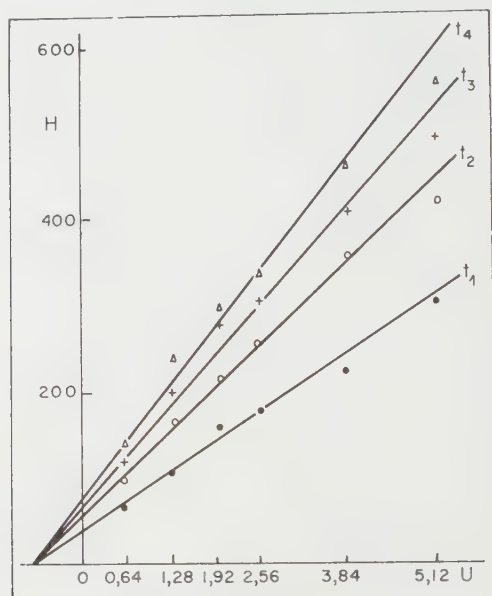


FIG. 3. — Proportionnalité entre la concentration U de virus exprimée en unités hémagglutinantes Hirst et l'activité hémolytique H exprimée en unités conventionnelles, pour des lectures réalisées après des temps d'incubation  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$  respectivement de 20, 40, 60 et 100 minutes d'incubation à 37°. Remarquer que l'origine du faisceau de droite part d'une valeur négative des abscisses, ce qui est dû à un certain degré d'hémolyse spontanée non imputable au virus.

du temps  $t_1$ , mesure la concentration en facteur hémolytique. Par convention, on a choisi  $t_1 = 120$  minutes à 37° et on exprime Q par la densité optique à 560 mμ du surnageant de centrifugation, multipliée par le facteur  $10^3$ .

Ainsi que le montre la figure 4 dans le cas des hématies humaines, la vitesse de l'hémolyse dépend fortement de la température; en revanche ses variations sont négligeables quand on passe des hématies d'un sujet à un autre appartenant au groupe O, et indépendantes du facteur rhésus. Elle atteint une valeur maximum pratiquement constante dans la zone des pH comprise entre 7,20 et 8,75 et dépend peu de la concentration initiale en



hématies à condition que l'on tienne compte, en la soustrayant, de l'hémolyse spontanée observée dans une réaction témoin en l'absence de virus. Cette hémolyse, en effet, n'est pas négligeable

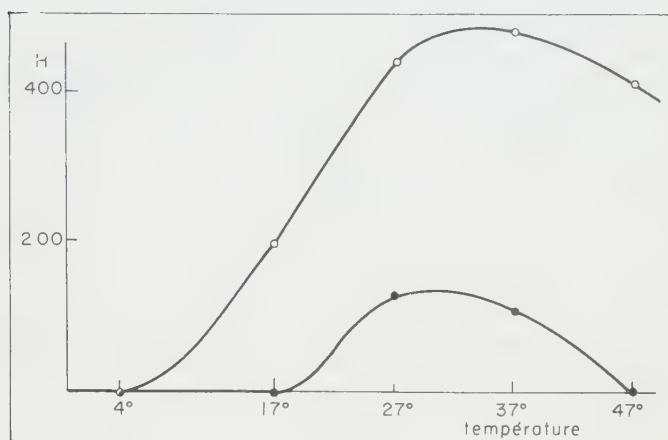
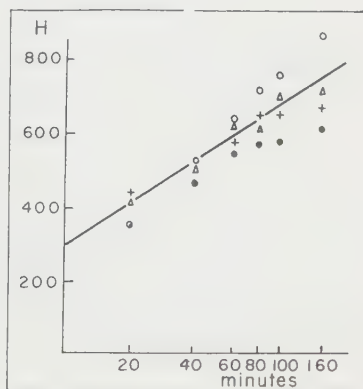


FIG. 4. — Influence de la température sur l'activité hémolytique H exprimée en unités conventionnelles, sur des hématies humaines O Rh+ (cercles vides) et sur des hématies de mouton (cercles pleins).

FIG. 5. — Influence de la concentration initiale en hématies. En abscisses, le logarithme décimal du temps exprimé en minutes. En ordonnées, l'activité hémolytique exprimée en unités conventionnelles, déduction faite de l'hémolyse observée dans une suspension témoin d'hématies en l'absence de virus. Il en résulte une imprécision dans les valeurs calculées d'autant plus grande que l'hémolyse spontanée est elle-même plus élevée. Celle-ci est proportionnelle à la concentration initiale en hématies.



pour les concentrations élevées en hématies (fig. 5). En définitive, les conditions normalisées dans lesquelles nous nous plaçons pour mesurer l'activité hémolytique sont les suivantes.

On réalise tout d'abord une suspension à 1 p. 100 d'hématies

humaines du groupe O dans une solution de chlorure de sodium 0,3 M diluée à partie égale avec une solution tampon phosphate 0,15 M de pH 7,4. Dans un tube à essais, on mesure 4,5 cm<sup>3</sup> de cette suspension d'hématies que l'on place au bain-marie à 37°. Lorsque l'équilibre de température est atteint, on ajoute 0,5 cm<sup>3</sup> de la solution hémolytique. Au bout de cent vingt minutes exactement, l'hémolyse est arrêtée en plongeant les tubes dans un bain froid à 0°. On centrifuge à froid. La densité optique est déterminée au spectrophotomètre à 560 mμ. La valeur obtenue multipliée par le coefficient 10<sup>3</sup>, exprime l'activité hémolytique en unités conventionnelles. Il convient naturellement, pour que la mesure ait quelque précision, que l'hémolyse obtenue ne soit pas totale.

TITRAGE DU POUVOIR INHIBITEUR DE L'HÉMOLYSE. — Pour mettre en évidence un inhibiteur éventuel, on s'est servi comme système de référence d'un mélange de liquides allantoïques infectés de titre hémolytique connu. Après avoir réalisé les mélanges indiqués dans le tableau I, les tubes à essais sont plongés dans un ther-

TABLEAU I.

Système hémolytique de référence	Hématies humaines O,rh+ à 1 p. 100	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Liquide allantoïque hémolytique	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Système de l'inhibiteur	Liquide embryonnaire contenant l'inhibiteur	0	0,2	0,4	0,6	0,8
	Tampon de dilution (pH 7,4)	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Dilution finale de l'inhibiteur		∞	2/55	4/55	6/55	8/55

mostat réglé à 37°. Au bout de deux heures on détermine la quantité d'hémoglobine libérée comme nous l'avons indiqué précédemment. La différence entre l'hémolyse obtenue sans inhibiteur et l'hémolyse obtenue en présence d'inhibiteur, constitue une mesure de l'activité de ce dernier. En effet, il y a proportionnalité entre cette valeur et la concentration d'inhibiteur utilisée, quelle que soit la concentration du système hémolytique de référence (fig. 6) et, d'autre part, la cinétique de l'hémolyse est la même en présence ou en l'absence d'inhibiteur.

TITRAGE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT. — Le pouvoir hémagglutinant et le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination ont été

déterminés sur des hématies humaines O, Rh + à la température de 18°, suivant les techniques de Hirst avec les modalités opératoires préconisées par Lépine et Sohier [42]. Ainsi, pour titrer le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination, on opère de la façon suivante.

Dans des tubes à hémolyse on introduit 4 unités hémagglutinantes de virus Sendai sous le volume de 0,25 cm<sup>3</sup>. On ajoute alors 0,25 cm<sup>3</sup> d'une série de dilutions de la solution d'inhibiteur

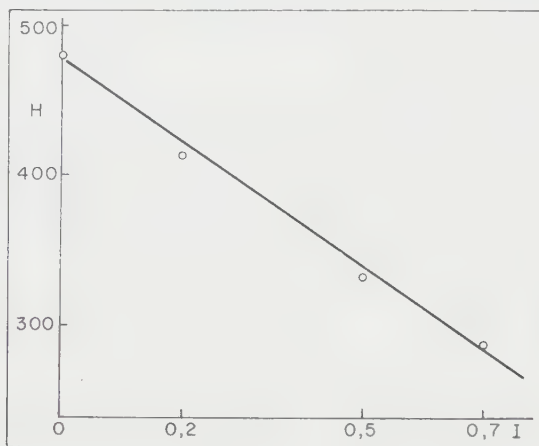


FIG. 6. — Influence de la concentration I en inhibiteur exprimée en centimètres cubes de liquide allantoïque introduit dans la réaction, sur l'activité hémolytique H exprimée en unités conventionnelles.

(liquide allantoïque d'un embryon de 13 jours par exemple). Après vingt minutes de repos à la température du laboratoire, on ajoute 0,5 cm<sup>3</sup> d'une suspension d'hématies à 0,5 p. 100. On lit les résultats dès que la sédimentation des hématies est achevée. La valeur de la dilution la plus élevée de la solution d'inhibiteur, qui inhibe totalement l'hémagglutination, est prise comme mesure de la capacité inhibitrice.

EMPLOI DU R. D. E. POUR DÉTRUIRE LES INHIBITEURS. — Le R. D. E. (3) est préparé de la manière suivante. On inocule dans la cavité allantoïque d'embryons de poulet de 11 jours 0,1 cm<sup>3</sup> de la dilution 10<sup>-3</sup> d'une culture de dix heures à 37° en bouillon ordi-

(3) R. D. E. : receptor-destroying-enzyme.

naire, de *Vibrio cholerae* (souche 4 Z). Après une incubation de seize heures à 37°, les liquides allantoïques sont prélevés, centrifugés, filtrés. Après vérification de la stérilité et de l'activité, le filtrat est utilisé directement suivant les modalités préconisées par Davoli [7] (tableau II). Après quatorze à seize heures d'incuba-

TABLEAU II.

	Epreuve	Contrôle
Soluté isotonique de Chlorure de sodium (cm <sup>3</sup> )	0	0,6
Solution tamponnée de Chlorure de calcium (1)	0,1	0,1
Solution contenant l'inhibiteur à détruire	0,1	0,1
R.D.E.	0,6	0
Pénicilline	20 U.	20 U.
37° pendant 14 - 16 h.		
Solution saturée de Citrate de sodium	0,05	0,05
56° pendant 30 minutes. Dilution résultante de l'inhibiteur 1/8		
(1) Acétate de sodium 0,2 M : 9,5 cm <sup>3</sup> . Acide acétique 0,2 M : 0,5 cm <sup>3</sup> . On ajoute 1 cm <sup>3</sup> d'une solution de chlorure de calcium à l. p. 100.		

tion du mélange de l'inhibiteur et du R. D. E. en présence de calcium, on inhibe l'enzyme par addition de citrate et chauffage à 56°. On titre alors l'activité inhibitrice de l'hémagglutination ou de l'hémolyse suivant la méthode décrite.

EMPLOI DE LA TRYPSINE POUR DÉTRUIRE LES INHIBITEURS. — La trypsine employée est celle de l'Institut Pasteur [4]. Elle a été utilisée aux concentrations finales de 1,25 et de 0,625 mg/cm<sup>3</sup>. Après trois heures d'incubation à 37°, l'épreuve de l'inhibition de l'hémagglutination ou de l'hémolyse est pratiquée directement.

EMPLOI DU PERIODATE POUR DÉTRUIRE LES INHIBITEURS. — Le periodate a été utilisé de la manière suivante. A une dilution au demi, dans du tampon phosphate 0,066 M de pH 7 des liquides

(4) Serpasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris.



embryonnaires contenant des inhibiteurs, on ajoute un volume égal d'une solution aqueuse de periodate de potassium à 0,5 g pour 100 cm<sup>3</sup>. Après avoir abandonné le mélange vingt minutes à la température du laboratoire, on ajoute un volume égal d'une solution de glucose à 10 g pour 100 cm<sup>3</sup> dans l'eau salée à 0,9 g pour 100 cm<sup>3</sup>. Vingt minutes plus tard, le titre inhibiteur de l'héماغglutination est éprouvé comparativement à celui du même liquide embryonnaire ayant subi les mêmes opérations, mais pour lequel la solution de periodate a été remplacée par de l'eau.

### RÉSULTATS.

Ayant été amenés à inoculer les embryons de poulet dans le courant du onzième jour d'incubation au lieu du dixième jour comme nous faisons d'ordinaire, nous avons constaté lors de la récolte après quarante-huit heures d'incubation supplémentaire à 35°, que le titre héماغglutinant des liquides allantoïques était faible ou nul. L'importance de l'âge de l'embryon au moment de l'inoculation apparaît dans le tableau III.

TABLEAU III.

Inoculation de 0,1cm <sup>3</sup> (dilution 10 <sup>-4</sup> ) dans la cavité allantoïque d'oeufs embryonnés âgés de :	Au moment de la récolte les oeufs ayant subi une incubation supplé- mentaire de 48 h à 35° sont âgés de :	Titres héماغglutinants moyens des liquides allantoïques au moment de la récolte :
9 jours	11 jours	1/160
10 jours	12 jours	1/640
11 jours	13 jours	0

On sait que dans le cas de la souche PR8 du virus grippal [8, 14] et également dans le cas du virus des oreillons [2] et dans celui de la maladie de Newcastle [6, 10], apparaissent dans le liquide allantoïque au douzième jour d'incubation des inhibiteurs de l'héماغglutination. Il est facile de mettre en évidence de tels inhibiteurs dans le cas du virus Sendaï, encore que leur concentration paraisse très variable d'un embryon à un autre et semble présenter une certaine périodicité saisonnière. Pour cela des lots d'embryons de poulet respectivement aux septième, huitième, neuvième, dixième, onzième et douzième jours d'incubation à 39°, sont incubés pendant quarante-huit heures à 35° *sans être inoculés*. A ce moment, c'est-à-dire après une incubation totale respective de neuf, dix, onze,

douze, treize et quatorze jours, on recueille séparément le liquide amniotique et le liquide allantoïque de chacun des embryons. On titre alors le pouvoir d'inhibition de l'hémolyse et de l'héماغglutination. Les résultats apparaissent dans le tableau IV. On voit qu'un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'héماغglutination et de l'hémolyse apparaît au onzième jour dans les liquides embryonnaires.

Si on opère sur des embryons *inoculés* par les virus Sendaï respectivement aux septième, neuvième, dixième, onzième et douzième jours d'incubation à 39°, puis incubés deux jours, à 35°, on constate que les titres héماغglutinants des liquides allantoïques sont plus élevés pour les œufs inoculés au neuvième jour que pour ceux

TABLEAU IV.

Age des embryons au moment de l'inoculation	Age des embryons au moment de la récolte des liquides embryonnaires	Nature du liquide embryonnaire étudié : AM:amniotique AL:allantoïque	Concentration de l'inhibiteur de l'héماغglutination sur 1 lot de 4 œufs				Concentration de l'inhibiteur de l'hémolyse sur le même lot de 4 œufs			
			1er œuf	2ème œuf	3ème œuf	4ème œuf	1er œuf	2ème œuf	3ème œuf	4ème œuf
7 jours	9 jours	AL	0	0	0	0	0	0	0	0
		AM	0	0	0	0	0	0	0	0
8 jours	10 jours	AL	0	0	0	0	0	25	135	-
		AM	0	0	0	0	0	10	35	-
9 jours	11 jours	AL	1/8	1/16	1/8	1/16	-	160	130	160
		AM	0	1/8	0	1/8	25	-	40	65
10 jours	12 jours	AL	1/16	1/4	1/8	1/8	160	140	120	100
		AM	1/64	1/16	1/4	1/4	160	100	90	190
11 jours	13 jours	AL	1/8	1/8	1/4	1/32	140	120	90	110
		AM	1/64	1/64	1/16	1/8	100	130	-	80
12 jours	14 jours	AL	1/8	1/4	1/16	1/32	140	120	100	140
		AM	1/32	1/16	1/64	1/16	80	120	100	140

inoculés plus tardivement. Si l'inoculation est faite au onzième ou douzième jour les titres héماغglutinants et héماغlytiques observés sont très bas et souvent nuls. On a vérifié que, dans ce dernier cas, les liquides amniotiques et allantoïques contiennent des titres très élevés d'inhibiteurs de l'hémolyse et de l'héماغglutination.

On a étudié systématiquement l'effet de la température, du periodate, du R. D. E. et de la trypsine pour tenter de dissocier les propriétés d'inhibition de l'héماغglutination de celles d'inhibition de l'hémolyse. On a constaté que toutes les deux résistent parfaitement à un chauffage d'une heure à 65°, mais en revanche se trouvent détruites par le periodate et par le R. D. E. La trypsine détruit également l'inhibiteur de l'héماغglutination, mais son effet sur l'inhibiteur de l'hémolyse n'a pu être mis en évidence, car elle inhibe par elle-même les propriétés hémolytiques du virus Sendai.

#### DISCUSSION.

L'inhibiteur de l'hémolyse d'une part et celui de l'héماغglutination d'autre part, se comportent tout à fait parallèlement dans les différentes épreuves, notamment vis-à-vis du chauffage, du periodate ou de la neuraminidase du vibron cholérique. Il est donc probable qu'ils ne constituent en réalité qu'une seule et même substance. Celle-ci, qui pourrait être une mucoprotéine, possède tous les caractères de l'inhibiteur identifié par Beveridge en 1946 [2] vis-à-vis du virus des oreillons, en 1947 par Cunha, Weil, Beard et Taylor [6] vis-à-vis du virus de la maladie de Newcastle, en 1948 par Svedmyr puis par Hardy vis-à-vis du virus A de la grippe, inhibiteur qui apparaît également dans les liquides embryonnaires au douzième jour [8, 14].

Des considérations embryologiques permettent de donner une explication de cette apparition soudaine d'inhibiteurs au douzième jour d'incubation. A ce moment, en effet, s'établit dans l'œuf embryonné une communication entre l'amnios, et les restes du blanc d'œuf contenus dans le sac de l'albumen d'autre part. L'entrée de l'albumen dans la cavité amniotique modifie profondément les caractéristiques du liquide de celle-ci, elle en augmente notamment la teneur en protéines et la viscosité. Elle doit évidemment y introduire les mucopolysaccharides contenus dans l'albumen, notamment l'ovomucine que l'on sait être un inhibiteur puissant de l'héماغglutination [11]. Mais depuis le neuvième jour, l'embryon a commencé des mouvements de déglutition qui deviennent de plus en plus fréquents à mesure que s'avance le développement. Ainsi l'embryon avale le liquide amniotique. La pénétration de l'albumen dans ce dernier entraîne donc secondairement une modification de la composition du liquide allantoïque où s'accumule les produits de l'élimination rénale de l'embryon. En effet, on voit le liquide allantoïque dès cet instant, se charger en urates, tandis que le pH légèrement alcalin jusqu'alors, devient franchement acide. On conçoit aisément que du fait de l'élimination des déchets, le liquide allantoïque puisse se

charger à son tour des inhibiteurs primitivement contenus dans l'albumen pour peu qu'ils ne soient pas métabolisés ou ne le soient que partiellement.

### CONCLUSIONS.

Le virus Sendai (*Myxovirus parainfluenzae* I) est ordinairement hémolytique et hémagglutinant; mais les titres hémolytique et hémagglutinant observés dans les liquides allantoïques d'embryons de poulet infectés, peuvent se trouver considérablement abaissés et même annulés si l'inoculation est pratiquée après le dixième jour, du fait de l'apparition dans les liquides embryonnaires d'un inhibiteur non spécifique. Ce dernier, thermostable, peut être détruit par le periodate, la trypsine et le R. D. E. Des considérations embryologiques permettent de penser qu'il pourrait être identifié à l'ovomucine de l'albumen.

Au point de vue pratique, le moment optimum pour l'inoculation des embryons par la voie allantoïque à l'aide du virus Sendai est le neuvième jour d'incubation. L'inoculation sera pratiquée avec une dilution assez faible ( $10^{-4}$ ), et les liquides embryonnaires récoltés après une incubation supplémentaire de deux jours à 35°. On évitera le mélange des liquides allantoïque et amniotique, car l'inhibiteur apparaît plus précocement et se trouve plus concentré dans ce dernier.

### SUMMARY

#### INHIBITOR INTERFERENCE

IN THE COURSE OF *Myxovirus parainfluenzae* I (SENDAI VIRUS)  
DEVELOPMENT IN EMBRYONATED CHICKEN EGG.

Sendai virus is generally hemolytic and hemagglutinating, but hemolytic and hemagglutinating titres observed in allantoic fluids of infected chick embryos may be considerably lowered and even become nil, if inoculation is carried out later than the tenth day, because of the appearance of a non specific inhibitor in the embryo fluids. This inhibitor is thermostable, is destroyed by periodate, trypsin and RDE. It might be identified with albumen ovomucin.

From a practical viewpoint, the optimum time for inoculation of Sendai virus into chick allantois is the ninth day of incubation. The inoculation should be carried out with a rather low dilution ( $10^{-4}$ ) and the embryo fluids taken after another two days incubation at 35°. Mixing of allantoic and amniotic fluids should be avoided, because the inhibitor appears earlier and is more concentrated in amniotic fluid.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDREWS (C. H.). *Virology*, 1959, **8**, 129.
- [2] BEVERIDGE (W. I. B.) et LIND (P. E.). *Aust. J. exp. Biol.*, 1946, **24**, 127.
- [3] COLLIER (B.). *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 617.
- [4] COLOBERT (L.) et FONTANGES (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 1382.
- [5] COLOBERT (L.) et FONTANGES (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 3238.
- [6] CUNHA (R.), WEIL (M. L.), BEARD (D.), TAYLOR (A. R.), SHARP (D. G.) et BEARD (J. W.). *J. Immunol.*, 1947, **52**, 69.
- [7] DAVOLI (R.). *O. M. S., 3<sup>e</sup> cours de Virologie*, Inst. Pasteur, Paris, 1958.
- [8] HARDY (P. H.) et HORSFALL (F. L.). *J. exp. Med.*, 1958, **88**, 463.
- [9] JENSEN (K. E.), MINUSE (E.) et ACKERMAN (W. W.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 71.
- [10] LANNI (F.) et BEARD (J. W.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **68**, 312.
- [11] LANNI (F.), SHARP (D. G.), ECKERT (E. A.), DILLON (E. S.), BEARD (D.) et BEARD (J. W.). *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 1275.
- [12] LÉPINE (P.) et SOHIER (R.). *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des Maladies à Virus*. Masson, édit., Paris, 1954.
- [13] LWOFF (A.), ANDERSON (T. F.) et JACOB (F.). *Ann. Int. Pasteur*, 1959, **97**, 281.
- [14] SVEDMYR (A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 285 et 309.

## ANTIGÈNE POLIOMYÉLITIQUE POUR FIXATION DU COMPLÈMENT

par Françoise ARTZET <sup>\*</sup>.

(avec la collaboration de M. L. RYHINER).

(Institut Pasteur, Service des Virus [D<sup>r</sup> P. LÉPINE])

Alors que la culture du virus poliomyélitique sur reins de singe laissait espérer l'obtention facile, et en quantités importantes, d'antigènes pour fixation du complément, le titre faible des liquides surnageants rendait indispensable une concentration ultérieure par des procédés physiques appropriés, ultrafiltration par exemple [8], ultracentrifugation [2] ou encore pervaporation. Malgré une étude systématique relativement récente [7] et la substitution aux cellules de rein de singe de cellules cancéreuses de souche apparemment plus satisfaisantes, les antigènes ainsi obtenus restent trop souvent de titre faible et la suppression du sérum dans les milieux de maintien ne suffit pas à éliminer un pouvoir anticomplémentaire non négligeable. C'est ainsi qu'il nous a semblé intéressant d'appliquer au virus poliomyélitique une méthode mise au point dans le laboratoire du P<sup>r</sup> Sven Gard pour le virus herpétique [4] qui consiste à extraire l'antigène des cellules infectées à un stade précoce de l'infection.

### MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

**CELLULES.** — Cellules de souche KB, qui provient d'un épithéliome buccal humain [3], entretenues en boîtes de Roux de 1 l (100 ml de suspension cellulaire à 10<sup>5</sup> cellules/ml) ou en grandes boîtes de 3,5 l (500 ml de la même suspension).

**MILIEUX.** — Pour la croissance cellulaire, milieu à l'hydrolysate de caséine [4], additionné de 15 p. 100 de sérum de veau, remplacé au moment de l'inoculation par le même milieu à l'hydrolysate de caséine, avec seulement 2,5 p. 100 de sérum.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1960

VIRUS. — Souches classiques de virus poliomyélitique, Mahoney pour le type I, MEF1 pour le type II et Saukett pour le type III. Le virus-stock pour les inoculations a été préparé sur cellules KB.

#### FIXATION DU COMPLÉMENT (1).

DILUANT. — C'est le tampon au véronal avec calcium et magnésium de Mayer, Osler, Bier et Heidelberger [6] régulièrement utilisé dans le laboratoire pour les réactions sérologiques, et dans lequel sont dilués tous les réactifs.

La réaction est exécutée en petits tubes à hémolyse de  $9 \times 90$  mm.

SÉRUMS. — On a utilisé jusqu'ici des sérums humains connus pour contenir des anticorps fixant le complément [5]. Tous les sérums sont inactivés avant la réaction par chauffage à  $56^{\circ}$  pendant trente minutes.

ANTIGÈNES. — Ils sont préparés selon la technique suivante.

*Inoculation* : les boîtes sont inoculées au moment où elles présentent un tapis cellulaire continu (quatre, cinq jours après l'ensemencement et un changement de milieu) : une boîte de Roux contient alors 2 à  $3.10^7$  cellules et une boîte de 3,5 l, 10 à  $15.10^7$ .

La dilution de l'inoculum, fonction du titre de virus employé, est calculée de manière à introduire le nombre de particules infectieuses nécessaire pour assurer l'infection de toutes les cellules, soit 4 à 5 particules pour une cellule, sous un volume tel qu'il permette la meilleure dispersion des éléments virulents sur la surface de la boîte. Par exemple, pour un virus de titre ( $DI_{50}$ )  $10^8$ /ml, et une boîte de Roux contenant  $3.10^7$  cellules, on inoculera 15 ml de la suspension virulente diluée au 1/10. L'inoculum est introduit après élimination du milieu de croissance remplacé par 100 ml de milieu sans sérum, et les bouteilles remises à l'étuve à  $37^{\circ}$ .

*Récolte* : au temps du prélèvement (entre la 21<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> heure après l'infection dans les conditions d'inoculation ci-dessus indiquées), les cellules fortement lésées se détachent spontanément du verre et il suffit d'une agitation de la bouteille pour entraîner la nappe cellulaire en son entier. Le contenu de la bouteille est

(1) Nous remercions M<sup>me</sup> J. Virat d'avoir accepté les réactions de fixation de complément dans son laboratoire, et M. J. Bourel de les avoir exécutées.

alors centrifugé à faible vitesse, de manière à séparer milieu et culot cellulaire.

Le surnageant S prélevé est conservé pour contrôle par fixation du complément et les cellules remises en suspension dans un volume de tampon au véronal correspondant à la concentration souhaitée, par exemple 5 ml pour une boîte de Roux de 1 l, soit une concentration de 20 fois, exprimée par le rapport entre le volume de tampon au véronal et le volume initial de milieu. Après homogénéisation par pipetage, cette suspension est congelée en couche mince à  $-40^{\circ}$ ,  $-50^{\circ}$  (mélange alcool-neige carbonique par exemple) puis décongelée au bain-marie à  $30^{\circ}$ - $35^{\circ}$ . L'opération est répétée cinq fois et le résultat centrifugé à faible vitesse quelques minutes de manière à précipiter les débris cellulaires. Le surnageant de cette dernière centrifugation est l'antigène C du culot cellulaire.

Parallèlement, on traite de même des cellules KB normales non inoculées de même âge ; le culot cellulaire est repris dans un volume équivalent de tampon au véronal, congelé-décongelé, centrifugé : c'est « l'antigène témoin normal ».

COMPLÉMENT. — Sérum de cobaye conservé congelé à  $-70^{\circ}$ .

On utilise 1,5 unité, et le titre du complément est contrôlé avec chaque série de réactions sur 4 tubes (quantités décroissantes de complément, 1,5-1-0,75 et 0,5 unité).

SYSTÈME HÉMOLYTIQUE. — Suspension d'hématies de mouton à 2 p. 100 sensibilisées à volume égal avec un sérum hémolytique de lapin (3 unités dans 0,1 ml).

Les réactifs sont introduits sous les volumes suivants :

Sérum .....	0,1 ml
Antigène .....	0,1 ml
Complément .....	0,2 ml
Système hémolytique .....	0,2 ml

Les témoins suivants, outre le contrôle du titre du complément et un antigène normal, déjà mentionnés, accompagnent la réaction :

a) Témoin antigène : chaque dilution d'antigène reçoit, en l'absence de sérum, 1,5 unité de complément, ce qui permet de déceler tout pouvoir anticomplémentaire éventuel :

b) Témoin sérum : de même et dans le même but chaque dilution de sérum, en l'absence d'antigène, reçoit 1,5 unité de complément.

c) Témoin antigène positif connu : à chaque série de réactions on adjoint un antigène préalablement titré, permettant de vérifier la positivité du sérum, aussi bien que de comparer la valeur des antigènes d'un lot à l'autre.



La fixation du complément se fait par séjour de dix-huit heures à  $+4^{\circ}$ , le système hémolytique est alors ajouté, la lecture a lieu immédiatement après l'incubation à  $37^{\circ}$ , quinze minutes (2).

RÉSULTATS. — Les titres obtenus, équivalents pour les trois types, sont compris entre le 1/4 et le 1/8 pour une concentration de 20 fois, et entre le 1/8 et le 1/16 pour une concentration de cinquante fois.

On donne dans les tableaux I, II et III l'exemple de titrages

TABLEAU I. — Evolution de l'antigène du type I.

Antigènes	Dilutions du Sérum					Témoins antigènes
	8	16	32	64	128	
24 h S 1/1	tr.	0	0	0	0	1
24 h C 1/1	4	4	4	4	3	0
1/2	4	4	4	4	2	0
1/4	4	4	4	4	tr.	0
1/8	4	4	4	2	0	0
48 h S 1/1	tr.	4	4	4	2	1
1/2	0	tr.	1	0	0	0
48 h C 1/1	3	1	tr.	0	0	0
1/2	0	0	0	0	0	0
Normal 1/1	0	0	0	0	0	0
Témoin sérum	0	0	0	0	0	0

Témoins antigènes, témoin sérum, S, C (voir texte : « Fixation du complément »)  
Expression de l'hémolyse : 0 hémolyse totale ; 4 absence totale d'hémolyse ;  
1-2-3 degrés intermédiaires ; tr. traces d'hématies.

d'antigènes de chacun des trois types (concentration vingt fois). Les culots cellulaires correspondants ont été prélevés à la 24<sup>e</sup> heure. C'est à ce temps que l'on peut extraire la plus grande quantité d'antigène des cellules, après quoi il se dilue progressivement

(2) On peut réaliser des économies appréciables d'antigène, en substituant à la méthode classique en tubes, une microméthode sur plaque. Cf. *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*, par P. LÉPINE et R. SOHIER, p. 97.

dans le milieu et sa concentration y est alors si faible qu'on ne peut, même autour de la 48<sup>e</sup> heure, déceler que de très faibles titres.

Nous ne pouvons pour le moment affirmer qu'il y ait entre les trois types de virus une différence importante dans l'évolution de l'antigène en fonction du temps.

Aucun des antigènes préparés dans ces conditions ne s'est révélé anticomplémentaire, comme l'indiquent les témoins antigènes des tableaux I, II et III.

TABLEAU II. — Evolution de l'antigène du type II.

Antigènes	Dilutions du Sérum					Témoins antigènes
	8	16	32	64	128	
24 h S 1/1	tr.	1	2	2	tr.	tr.
24 h C 1/1	4	4	4	2	0	0
1/2	4	4	4	3	0	0
1/4	4	4	4	4	0	0
1/8	1	3	2	tr.	0	0
48 h S 1/1	3	4	4	4	3	tr.
1/2	0	tr.	1	tr.	0	0
48 h C 1/1	4	4	1	0	0	0
1/2	3	1	0	0	0	0
normal 1/1	0	0	0	0	0	0
Témoin sérum	0	0	0	0	0	0

Témoins antigènes, témoin sérum, S, C (voir texte « Fixation du complément »).  
Expression de l'hémolyse : 0 hémolyse totale ; 4 absence totale d'hémolyse ;  
1-2-3 degrés intermédiaires ; tr. traces d'hématies.

D'autre part, on n'observe pas de réaction aspécifique entre les sérums humains employés et les témoins cellules KB normales concentrés dans les mêmes proportions que les antigènes spécifiques.

#### DISCUSSION.

On est surpris de constater que les titres du matériel antigénique prélevé avant sa libération — et sa dilution — dans le milieu, soient encore aussi faibles, mais c'est probablement là l'explication des difficultés à obtenir des liquides surnageants de titre appréciable.

L'antigène est difficile à extraire des cellules au sein desquelles il se forme (les 6 congélations-décongélations suffisent à peine à épuiser le culot cellulaire) ; on conçoit, dans ces conditions, que l'autolyse progressive des cellules infectées par un séjour prolongé à 37° puisse contribuer à améliorer le titre du matériel antigénique [5].

TABLEAU III. — Evolution de l'antigène du type III.

Antigènes	Dilutions du Sérum					Témoins antigènes
	8	16	32	64	128	
24 h S 1/1	tr.	0	0	0	0	tr.
24 h C 1/1	4	4	4	4	3	0
1/2	4	4	4	4	2	0
1/4	4	4	4	4	1	0
1/8	2	2	2	1	0	0
48 h S 1/1	1	2	2	3	2	0
1/2	0	0	0	0	0	0
48 h C 1/1	4	3	1	0	0	0
1/2	2	1	tr.	0	0	0
Normal 1/1	0	0	0	0	0	0
Témoin sérum	0	0	0	0	0	0

Témoins antigènes, témoin sérum, S, C (voir texte : « Fixation du complément »)  
 Expression de l'hémolyse : 0 hémolyse totale ; 4 absence totale d'hémolyse ;  
 1-2-3 degrés intermédiaires ; tr. traces d'hématies.

Le chauffage, utilisé habituellement pour diminuer le pouvoir anticomplémentaire d'antigènes provenant de cultures de tissus — au détriment de leur spécificité — n'est pas ici indispensable. Ce peut être, cependant, un procédé d'atténuation de la virulence, et nos antigènes, dont le titre ne s'est pas modifié en deux mois de conservation, ont résisté à un chauffage, trente minutes, au bain-marie à 56° et 60°.

Quant à la spécificité de ces antigènes, il faudra attendre les résultats d'ensemble concernant les différentes réactions sérologiques de la poliomyélite, qui seront publiés par ailleurs, pour conclure.

Certaines expériences préliminaires semblent indiquer qu'on a

là une méthode assez générale, applicable à d'autres virus pour lesquels il est difficile d'obtenir à partir de cultures de tissus des antigènes fixant le complément satisfaisants (virus ECHO. Cox-sackie B, rougeole, par exemple).

Enfin, nous avons utilisé cette méthode pour établir la courbe d'évolution, en fonction du temps, du matériel antigénique. Le mode de formation de la fraction active dans le cas de la poliomyélite, sa relation avec la particule infectieuse et sa nature font l'objet d'études en cours.

#### RÉSUMÉ.

Description de la technique de préparation d'un antigène poliomyélitique pour fixation de complément à partir de la phase cellulaire de cultures infectées. L'antigène ainsi obtenu est dépourvu de pouvoir anticomplémentaire, et il est de titre supérieur à celui des surnageants de culture. Application possible au diagnostic de la poliomyélite par fixation de complément et à la préparation d'autres antigènes viraux.

#### SUMMARY

##### PREPARATION OF A POLIOMYELITIC ANTIGEN WITH A VIEW TO COMPLEMENT FIXATION.

The author describes the technique of the preparation of this antigen, using the cellular phase of infected cell cultures.

This antigen is not anti-complementary. Its titer is higher than that of culture supernatants.

Its use for poliomyelitis diagnostic by means of complement fixation, and the application of the technique to the preparation of other viral antigens are discussed.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARTZET (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 777.
- [2] BLACK (F. L.) et MELNICK (J. L.). *Yale J. biol. Med.*, 1954, **26**, 385-393.
- [3] EAGLE (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 362-364.
- [4] LÉPINE (P.), DANIEL (Ph.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 567-575.
- [5] MAURIN (J.), CARRÉ (M.-C.) et VIRAT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 211-223.
- [6] MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535-548.
- [7] SCHMIDT (N. J.), LENNETTE (E. N.), DOLEMAN (J. H.) et HAGENS (S. J.). *Amer. J. Hyg.*, 1957, **66**, 1-19.
- [8] SVEDMYR (A.), ENDERS (J. F.) et HOLLOWAY (A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **79**, 296-300.



# DÉLIMITATION DE LA NOTION DE FORMES L DES BACTÉRIES : PROTOPLASTES, SPHÉROPLASTES ET FORMES L

par R. TULASNE, R. MINCK, A. KIRN et J. KREMBEL (\*)

(Chaire de Biologie Bactérienne de la Faculté de Médecine  
de Strasbourg)

Nous avons insisté, depuis fort longtemps, ainsi d'ailleurs que Klieneberger-Nobel et surtout Dienes [1, 2, 3], sur l'usage erroné qui est fait du terme « formes L » des bactéries. Aussi nous paraît-il utile, une fois de plus, d'essayer de déterminer les limites dans lesquelles doit être inscrite la notion de « formes L » des bactéries. Nous profiterons de l'occasion qui nous est offerte pour dresser un tableau succinct de nos connaissances les plus récentes sur ces microorganismes.

Jusqu'à ces dernières années, la plupart des bactériologistes désignaient sous le nom de « formes L », des microorganismes obtenus au laboratoire sous l'action de substances diverses, en général la pénicilline, caractérisés par l'aspect de leurs colonies sur milieux solides, la morphologie microscopique et le polymorphisme des éléments composant les colonies, et l'existence d'un mode de reproduction différent de celui des bactéries d'origine.

Cette définition est maintenant dépassée, incomplète, et en partie erronée. Elle permettait cependant d'exclure du domaine des formes L des éléments filamenteux ou globuleux, de dimensions et de formes très diverses, découverts et décrits par de très nombreux auteurs dans des cultures bactériennes ou même dans des produits pathologiques provenant de l'homme ou des animaux, *mais dont la culture n'a jamais pu être réalisée.*

La délimitation des « formes L » dans le monde des microorganismes, semblait donc pouvoir être réglée assez facilement, lorsque fut introduite en microbiologie la notion de protoplaste.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1960.

## LES PROTOPLASTES

Le terme de protoplaste, employé depuis fort longtemps par les botanistes, a été utilisé pour la première fois au sujet des bactéries, par Weibull en 1953 [4], à la suite de travaux sur la structure de la paroi bactérienne, qui se poursuivent activement aujourd'hui [5].

Rappelons, à ce propos, pour éviter toute équivoque, que l'enveloppe des bactéries est constituée du dedans en dehors par :

1° *La membrane cytoplasmique*, bien individualisée, que limite le cytoplasme. Des émanations de cette membrane semblent constituer les septa qui se forment déjà à la fin de la division nucléaire chez les bactéries qui restent accolées.

2° *La paroi*, rigide, qui confère à la bactérie sa forme caractéristique. C'est la partie de l'enveloppe qui a fait l'objet des plus récents travaux. D'après certains auteurs, elle serait formée de deux ou trois couches superposées, de nature chimique différente [5].

3° *La capsule*, qui n'est pas indispensable à la vie bactérienne normale. Elle peut faire défaut chez certaines bactéries ; chez d'autres, elle peut être éliminée, en particulier par des enzymes. Une partie importante du pouvoir antigénique des bactéries, semble liée à la présence des substances composant cette capsule. Lorsque cette capsule est très mince, comme c'est le cas pour les bactéries à Gram négatif, elle porte le nom de microcapsule (Wilkinson [6]).

Sous l'action du lysozyme, on a pu dissoudre totalement la *paroi* de certaines bactéries à Gram positif et obtenir des organismes sphériques de grande taille, les protoplastes, que l'on a pu ensuite conserver dans des milieux protecteurs sans qu'ils se lysent.

Une inhibition plus ou moins complète de la formation de la paroi bactérienne a pu être également obtenue, dans certaines conditions, sous l'action de la pénicilline, chez d'autres bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Lederberg [7]). C'est à cause de leur aspect morphologique, conséquence de la disparition de leur paroi rigide, que le rapprochement des protoplastes avec les formes L des bactéries s'est imposé.

Certains auteurs, ne tenant compte que de l'aspect extérieur, sont même allés jusqu'à identifier protoplastes et formes L.

Il est donc indispensable, pour l'ouverture de discussions fructueuses entre les chercheurs travaillant soit sur les formes L, soit sur les protoplastes, qu'un accord soit réalisé sur la définition et la délimitation de l'un et de l'autre type d'organisme.

Le problème pourrait être simple, si tous les chercheurs adoptaient la position prise par un certain nombre d'auteurs réunis à Londres en 1958 (S. Brenner, F. A. Dark, P. Gerhardt, M. H. Jeynes, O. Kandler, E. Kellenberger, E. Klieneberger-Nobel, K. McQuillen, M. Rubio-Huertos, M. R. Salton, R. E. Strange, J. Tomesik, C. Weibull [8]), qui ont proposé de réserver le terme de protoplaste aux seuls organismes dont l'absence totale de paroi est démontrée par la mise en évidence d'un ou plusieurs tests à rechercher parmi les propriétés suivantes des « vrais protoplastes ». 1° Ces organismes ne peuvent subsister que dans des milieux appropriés dont la pression osmotique équilibre la pression intérieure des protoplastes. 2° L'analyse immunologique des protoplastes révèle l'absence de certaines fractions antigéniques qui existaient dans la paroi de la bactérie d'origine. 3° L'analyse chimique permet de constater l'absence de certains corps chimiques réunis par Salton sous le nom de « complexe mucoïde » et dont le plus connu est l'acide diamino-pimélique. 4° Les protoplastes n'ont plus le pouvoir d'absorber les phages.

Bien que les auteurs précités ne semblent pas enclins à les prendre en considération pour définir les protoplastes, deux autres propriétés pourraient également être attribuées à ces organismes : 1° Tous les chercheurs admettent, en effet, que les protoplastes sont incapables de reproduire les bactéries d'origine, car ils sont incapables de synthétiser une nouvelle paroi, même si on leur fournit le matériel chimique approprié. 2° Mise à part la possibilité, reconnue pour certains protoplastes, de se diviser en premières cultures, en *milieux liquides* (McQuillen [9]), tous les auteurs, à la suite de Weibull, estiment que la culture des « vrais protoplastes » en milieux solides n'est pas possible.

Si l'on s'en tenait strictement à la définition de Brenner et coll., à savoir : que le terme protoplaste doit être réservé aux seuls organismes dont l'absence de paroi est démontrée, il faudrait faire entrer dans ce groupe non seulement les quelques bactéries à Gram positif dont la paroi est sensible au lysozyme, mais encore tout un groupe d'organismes dont nous étudierons plus loin les caractéristiques sous le nom de « formes L des bactéries du type A », dont l'absence de paroi est certaine. Dans ce cas, la confusion qui règne actuellement sur l'ensemble des organismes globuleux issus des bactéries, persisterait. Mais si, dans la définition des protoplastes, on introduit les notions de l'irréversibilité

de ces organismes et de l'impossibilité où ils se trouvent de se multiplier sur des milieux solides, les formes L, quel qu'en soit leur type, seraient nettement séparées des protoplastes et tout deviendrait beaucoup plus clair.

## LES SPHÉROPLASTES

Ne tenant aucun compte des limites qui ont été assignées plus haut aux protoplastes, d'autres auteurs ont désigné sous ce vocable, des bactéries dont la paroi a été modifiée sans disparaître complètement au cours de traitements divers. Ceci est le cas, en particulier, pour des organismes issus de germes à Gram négatif, dont la paroi, assez complexe, serait constituée par une partie mucoïde analogue à celle des Gram positifs, responsable de la rigidité et de la morphologie du germe, et d'une seconde partie, moins bien connue, de nature lipo-protéique ou lipo-poly-saccharidique. A elle seule, la destruction de la fraction mucoïde aboutit, en milieu protecteur, à la formation d'organismes qui présentent le même aspect morphologique que les protoplastes de germes à Gram positif ainsi que la sensibilité au choc osmotique. *Mais ces organismes n'ont perdu qu'une fraction de leur paroi : ce ne sont donc pas des protoplastes vrais, selon la définition qui en a été donnée plus haut.*

Il a fallu leur donner un nom qui ne comporte pas, pour éviter les confusions, le mot de protoplaste. Weibull a proposé le nom de sphéroplaste. Nous verrons que ces organismes s'identifient à un type particulier de formes L.

La persistance d'une partie de la paroi, permet aux sphéroplastés d'absorber certains phages (Lederberg [7], Taubeneck [10]), et conditionne le pouvoir de multiplication par division directe de ces organismes, ainsi que la possibilité potentielle de synthétiser à nouveau une paroi complète : la réversion vers la forme bactérienne d'origine reste, en effet, possible, soit spontanément, après suppression de la pénicilline qui inhibe la synthèse d'une partie de la paroi, soit dans le cas de mutants déficients, lorsqu'on cultive ces organismes, en présence d'acide D. A. P. ou d'un extrait bactérien homologue.

Notons que les formes bactériennes géantes, dont nous avons signalé l'existence dans le genre *Vibrio* [11], font vraisemblablement partie de ce groupe de microorganismes. Elles ne réversent pas vers la forme bactérienne normale, après suppression de la pénicilline, mais nous ne pouvons affirmer que cet état soit définitif, car nous n'avons pas encore eu l'occasion de les cultiver en présence d'acide D. A. P.

Nous avons, jusqu'à présent, envisagé le problème posé sous l'angle des protoplastes et des sphéroplastes. Examinons-le maintenant sous celui des formes L.

## LES FORMES L DES BACTÉRIES

Depuis 1955, date de notre dernière revue générale sur les formes L [12], de nombreux travaux ont été publiés sur ce sujet.

La teneur de ces travaux, jointe à nos propres recherches, nous a amenés à apporter des modifications, parfois fort importantes, à nos conceptions sur ces microorganismes.

Nous donnerons ici une idée actuelle, quoique assez générale, de la question des formes L en basant nos descriptions et nos commentaires plus particulièrement sur les formes L des *Proteus* qui ont été, de beaucoup, les plus étudiées, nous réservant de discuter, dans nos commentaires ultérieurs, si ce que nous avons dit est applicable aussi aux formes L des autres bactéries.

### LES DEUX TYPES DE FORMES L.

C'est à Dienes que l'on doit la division des formes L en types A et B. La nécessité d'une telle distinction ne s'est pas fait sentir d'emblée, car elle semblait, à l'origine, presque uniquement basée sur les caractères morphologiques, parfois discutables. Nous n'avons, nous-mêmes, pas prêté assez attention, au début de nos recherches, à cette notion de type que nous n'avions signalée, à tort, qu'incidemment dans nos écrits antérieurs et qui est passée presque inaperçue jusqu'à ces dernières années.

Ce sont surtout des travaux de Kandler [13], confirmés par Minck et coll. [14], qui ont rendu toute son importance à cette notion. Ces auteurs ont montré, en particulier, que toute étude sérieuse sur les formes L devait porter obligatoirement sur des souches pures, spécialement isolées, des types A et B. Les deux types de formes L s'opposent, en effet, en de nombreux points portant aussi bien sur leur anatomie que sur leur évolution et sur leur mode de reproduction. Aussi, tout essai de généralisation des caractères et du comportement de l'ensemble des formes L fait à partir de l'étude d'un seul des deux types, ne peut mener qu'à l'erreur et à l'incompréhension.

Etudions donc chacun des types de formes L en commençant par les formes L du type B, qui, comme nous le verrons, constituent une sorte d'intermédiaire entre les bactéries et les formes L du type A.



## I. — LES FORMES L DU TYPE B.

Elles se développent sur les mêmes milieux que les bactéries d'origine.

## 1° ASPECT GÉNÉRAL DES COLONIES SUR MILIEUX SOLIDES.

Les colonies, lorsqu'elles ont atteint leur taille maximum, ont un diamètre de 2 à 5 mm, leur aspect est assez caractéristique et correspond aux descriptions classiques. Elles possèdent un centre assez dense et épais dont la partie inférieure est incrustée dans la gélose et une auréole plus ou moins large, mince et transparente. Ces colonies ont été très justement comparées par Dienes à des « œufs sur le plat ».

## 2° EXAMEN MICROSCOPIQUE DES COLONIES.

a) *Au contraste de phase.* — Les colonies L du type B sont constituées par des amas d'éléments arrondis — les corps globuleux — de taille sensiblement homogène (7 à 10  $\mu$ ), plus ou moins opaques, montrant parfois des images en croissant. Dans le centre de la colonie, ces corps globuleux sont tassés les uns contre les autres à la façon des cellules d'une morula. A la périphérie, dans l'auréole, ils se trouvent répartis en couche mince, quelquefois monocellulaire, à la surface du milieu (pl. II, fig. 26, 27, 29).

b) *Examen cytologique.* — Colorés au Giemsa, les corps globuleux, qui, rappelons-le, constituent les seuls éléments des colonies du type B, se présentent comme des masses à peu près uniformément basophiles. Parfois, une légère hétérogénéité de la coloration laisse deviner la possibilité d'une organisation interne. Après traitement, par la méthode de Robinow, modifiée par Cassel [45], on observe que les corps globuleux sont des éléments arrondis, organisés, comprenant une masse cytoplasmique à ARN et de nombreux noyaux à ADN. Ces corps globuleux sont peu fragiles. Les manipulations nécessaires pour leur mise en évidence ne les détruisent pas. Ils gardent leur aspect arrondi lorsqu'ils sont peu serrés les uns contre les autres à la périphérie des colonies et prennent une forme polygonale lorsqu'ils sont, au contraire, tassés dans le centre des colonies. Ces faits indiquent qu'ils sont limités par une enveloppe relativement rigide, présentant une certaine solidité. Notons, enfin, que la répartition de la basophilie parmi les corps globuleux constituant une colonie d'âge moyen indique que la plupart de ces éléments sont vivants et qu'il y a peu de lyse (pl. II, fig. 28, 31, 32).

## 3° PRINCIPALES PROPRIÉTÉS DES FORMES L DU TYPE B.

Les formes L du type B réversent en quelques heures vers la bactérie d'origine lorsqu'on supprime l'agent qui a provoqué leur formation. *Elles ne sont pas inhibées en culture par les anti-sérums spécifiques* (Minck [14]). Taubeneck [10], signale que le pouvoir d'adsorber les phages est conservé dans ce type. Elles ne passent pas à travers les filtres qui arrêtent les bactéries normales (Kellenberger et coll. [20], Tulasne [21]). Enfin, les travaux de Kandler [17], confirmés par Weibull et par Guillaume [22], montrent qu'elles contiennent de l'acide D. A. P. en quantité au moins égale à celui que renferment les bactéries du type normal.

## 4° MULTIPLICATION DES FORMES L DU TYPE B.

Comme le montrent sans contestation possible les observations au contraste de phase, l'analyse cytologique et surtout les films de Hutchinson, de Poetschke et de Taubeneck, que nous avons eu l'occasion de voir au Symposium d'Iéna, la multiplication des corps globuleux qui caractérisent le type B se fait par division directe (pl. II, fig. 25). Les divisions qui donnent, en général, naissance à des corps globuleux-fils de volume à peu près équivalent, contenant un nombre de noyaux sensiblement du même ordre, se produisent dans le fond du cratère creusé dans le milieu solide par le centre de la colonie. Les éléments nouvellement formés sont expulsés en surface où ils s'étalent et forment l'auréole translucide et muqueuse qui se trouve à la périphérie de la colonie.

Cependant, surtout au moment de leur formation aux dépens des bactéries, les corps globuleux peuvent se diviser d'une façon inégale, un grand corps globuleux pouvant donner naissance à des éléments plus petits. La division ressemble alors à un bourgeonnement.

Il est hors de doute que les formes L du type B, constituées, comme nous l'avons vu, par des corps globuleux, d'aspect relativement rigide, possédant une enveloppe contenant de l'acide D. A. P., capable d'adsorber les phages et de se multiplier par division directe, représentent une forme d'adaptation temporaire pour des bactéries dont la paroi a été privée, par le blocage provisoire du pouvoir de le synthétiser, du facteur conditionnant la rigidité nécessaire pour le maintien de la forme habituelle de la bactérie. Les formes L du type B ne diffèrent donc pratiquement des bactéries normales que par la forme. Il suffit, pour s'en convaincre, de comparer par exemple des préparations colorées par la méthode de Robinow-Cassel [15], correspondant à des

formes globuleuses du type B des *Proteus* et des formes nageuses multinucléées normales de cette même bactérie.

Le type B des formes L correspond à ce que nous avons désigné en 1955 sous le nom de formes N (terme provisoire auquel nous ne tenons d'ailleurs pas). Il se confond en tout point avec les sphéropastes de Weibull, mais les corps globuleux qui le constituent sont très différents des protoplastes dont nous avons donné plus haut la définition.

## II. — LES FORMES L DU TYPE A.

A l'exception, peut-être, de quelques espèces de bactéries à Gram positif (Dienes [3]), les formes L du type A ne se développent, quelles que soient les exigences des bactéries d'origine, que sur des milieux contenant du sérum.

### 1° ASPECT GÉNÉRAL DES COLONIES SUR MILIEUX SOLIDES.

Les colonies du type A sont, en règle générale, très petites. Leur diamètre ne dépasse pas 500  $\mu$ . Certaines d'entre elles ne peuvent être observées qu'à la loupe. Dans les premiers jours de leur développement, elles se présentent comme de petites taches aplaties, à contours irréguliers, légèrement incluses dans le milieu. Plus tard, un certain nombre d'entre elles font surface. Elles deviennent alors un peu plus grandes, leurs contours deviennent plus réguliers, elles sont légèrement bombées et elles prennent un aspect nacré.

### 2° EXAMEN MICROSCOPIQUE.

a) *Au contraste de phase.* Les colonies A sont constituées, lorsqu'elles sont jeunes, par des amas de granulations très fines [de 250 à 500 m $\mu$ ] (pl. I, fig. 21), très souvent groupées par deux. Les deux grains sont quelquefois si serrés que l'on a l'impression qu'il s'agit d'un petit bâtonnet. Après deux à trois jours de culture, quelques petits corps globuleux (moins de 5  $\mu$ ), viennent accompagner les granulations. Au contraste de phase, ces corps globuleux apparaissent pleins, vides ou granuleux. L'ensemble de la colonie est alors tout à fait comparable aux colonies de PPLO. Les petits corps globuleux peuvent rester rares ou devenir plus nombreux. Dans ce cas, ils forment souvent une petite collerette autour du centre granuleux de la colonie.

b) *Examen cytologique.* Colorées au Giemsa, les granulations et les corps globuleux apparaissent comme des éléments entièrement basophiles. Le traitement par la méthode de Robinow-Cassel [45] ne modifie que très peu la taille des granulations qui

conservent, par ailleurs, la plus grande partie de leur basophilie primitive. Il en résulte qu'elles sont constituées par un noyau central à ADN entouré d'une mince couche de cytoplasme à ARN. Les corps globuleux, contrairement à ce que nous avons observé pour le type B, ne semblent pas organisés. Ils apparaissent comme des amas résultant de la simple juxtaposition des granulations retenues accolées par leur viscosité. Ces amas n'ont pas, en général, de forme précise et sont très fragiles. Il semble donc qu'ils ne sont pas limités par une enveloppe résistante. Signalons encore que le pourcentage des éléments basophiles par rapport à l'ensemble des éléments présents est relativement faible, même si la culture examinée est jeune. Ce fait met en valeur la très grande fragilité des éléments constituant les formes L du type A (pl. I, fig. 22, 23, 24).

### 3° PRINCIPALES PROPRIÉTÉS.

Les formes L du type A sont stables. Elles ne réversent plus vers les bactéries d'origine, même lorsque l'on supprime l'agent inducteur. (Notons, à ce point de vue, que l'irréversibilité réelle des formes L demande quelquefois à être recherchée. Lederberg [7] a montré, en effet, que certaines formes L ne sont que des mutants déficients vis-à-vis de l'acide D. A. P. et qu'il suffit de les cultiver en présence d'acide D. A. P. ou d'un extrait bactérien contenant cet acide pour voir réapparaître, chez elles, la propriété de réverser). *Leur culture est inhibée par les antisérums correspondants* [16]. Elles ne possèdent plus le pouvoir d'adsorber les phages (Taubeneck [10]). Les granulations dont elles sont constituées passent à travers les membranes filtrantes et les calculs indiquent que les plus petits éléments, qui font partie de ce type mesurent environ 250 m (Kellenberger et coll. [20]), Tulasne et Lavillaureix [21]). *On ne trouve plus chez elles d'acide D. A. P.* (Kandler [17], Weibull et J. Guillaume [22]).

### 4° MULTIPLICATION DES FORMES L DU TYPE A.

L'observation des formes L du type A, obtenues en cultures pures, nous a amenés à réviser nos conceptions sur l'évolution et la multiplication de ces microorganismes. En ce qui concerne l'évolution, il est maintenant certain que les granulations, qui constituent ce type, n'ont plus aucune possibilité de réversion vers la bactérie d'origine. Ce fait est sûrement dû à l'absence totale de paroi chez ces éléments et à l'impossibilité qu'ils ont de pouvoir en synthétiser une nouvelle. C'est la persistance d'un ou de quelques corps globuleux du type B dans les colonies des formes L du type A qui nous avait conduit à envisager « le

cycle L complet » qui est, par conséquent, complètement abandonné. En ce qui concerne la multiplication, on peut considérer comme définitif le fait que les granulations qui constituent ce type, et que nous continuerons à appeler comme par le passé « *les formes naines* », se reproduisent par division directe (pl. I, fig. 1 à 10). Nous pensons, d'ailleurs, être en mesure, dans un proche avenir, de préciser les modalités exactes de cette division qui peut donner naissance à partir d'une forme naine-mère à deux formes naines-filles de taille à peu près égale, ou bien à des formes naines de taille très inégale. Dans ce cas, le plus petit des éléments provenant de la division peut ne contenir que du cytoplasme et se trouve, par conséquent, stérile. Cette conception de la division des formes L du type A rejoint, croyons-nous, celle de Kandler [48]. La division inégale des formes naines donne, en effet, des images telles qu'elles sont décrites en général à propos de la multiplication cellulaire par bourgeonnement. Après la division, les formes naines, dont la périphérie semble être assez visqueuse, restent souvent accolées pour former des amas plus ou moins volumineux, comprenant deux ou trois, mais parfois aussi une centaine de granulations nettement discernables sur des préparations traitées et colorées par la méthode de Robinow-Cassel, mais invisibles au contraste de phase. Avec ce dispositif, en effet, les amas apparaissent comme des éléments homogènes, de teinte uniformément grisâtre, et ce n'est qu'au moment de leur lyse que des granulations peuvent y devenir visibles.

Les gros amas qui constituent les corps globuleux du type A, auxquels nous avions jadis attribué une certaine importance, ne constituent, en réalité, que de minuscules colonies de formes naines. Parfois, ces corps globuleux se fragmentent spontanément et les formes naines ainsi libérées vont se diviser comme nous

#### PLANCHE I

FIG. 1 à 10. — Evolution de granulations du type A, suivie au contraste de phase à 37° pendant vingt-quatre heures.  $\times$  env. 1500.

FIG. 11 à 20. — Evolution d'un corps globuleux du type A, suivie au contraste de phase pendant vingt-quatre heures à 37° : fragmentation du corps globuleux, division des formes naines libérées : formation d'une colonie A.  $\times$  env. 1500.

FIG. 21. — Colonies du type A : contraste de phase.  $\times$  400.

FIG. 22. — Corps globuleux du type A, contraste de phase : forme très irrégulière.  $\times$  env. 600.

FIG. 23. — Colonies du type A : coloration de Robinow-Cassel. On voit nettement les formes naines.  $\times$  500.

FIG. 24. — Corps globuleux A : coloration de Robinow-Cassel. On distingue les formes naines qui constituent les corps globuleux.  $\times$  3500.



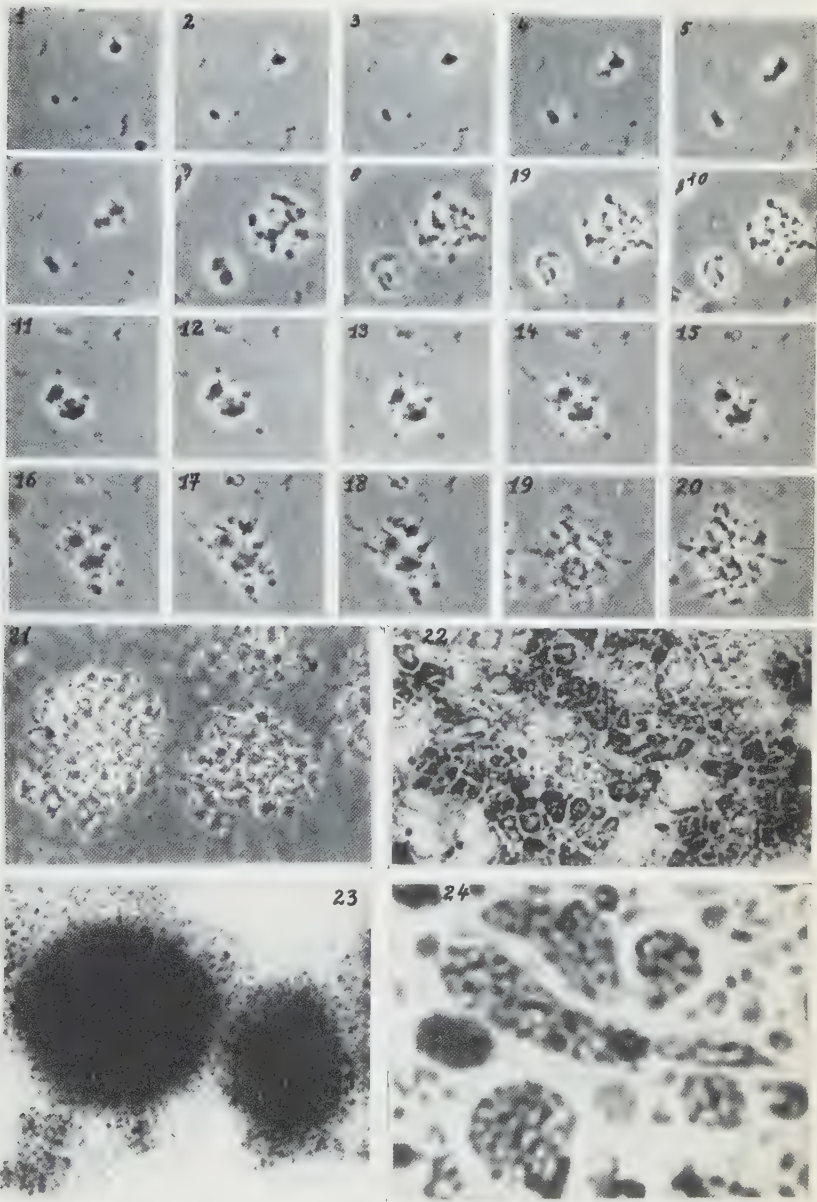


PLANCHE I.

MASSON ET C<sup>le</sup>, ÉDITEURS

## PLANCHE II

FIG. 25. — Division de corps globuleux du type B : contraste de phase.  $\times 400$ .

FIG. 26. — Colonies B, contraste de phase : on distingue les corps globuleux qui semblent solidement constitués.  $\times 400$ .

FIG. 27. — Colonies B, contraste de phase : corps en croissant.  $\times 300$ .

FIG. 28. — Corps globuleux du type B. Coloration Robinow-Cassel : on voit nettement les noyaux et l'enveloppe.  $\times 800$ .

FIG. 29. — Colonies B, contraste de phase.  $\times 600$ .

FIG. 30. — Colibacille traité par la méthionine, corps globuleux en œufs de grenouille, contraste de phase.  $\times 800$ .

FIG. 31. — Corps globuleux du type B. Robinow-Cassel.  $\times 3\,500$ .

FIG. 32. — Corps globuleux du type B tassés au centre d'une colonie. Robinow-Cassel.  $\times 300$ .

FIG. 33-34-35. — Formes naines du type A : microscope électronique, coupes ultra-fines : on distingue le noyau central multilobé (en voie de division dans la fig. 35), le cytoplasme granuleux, la membrane d'enveloppe.  $\times$  env. 35 000.

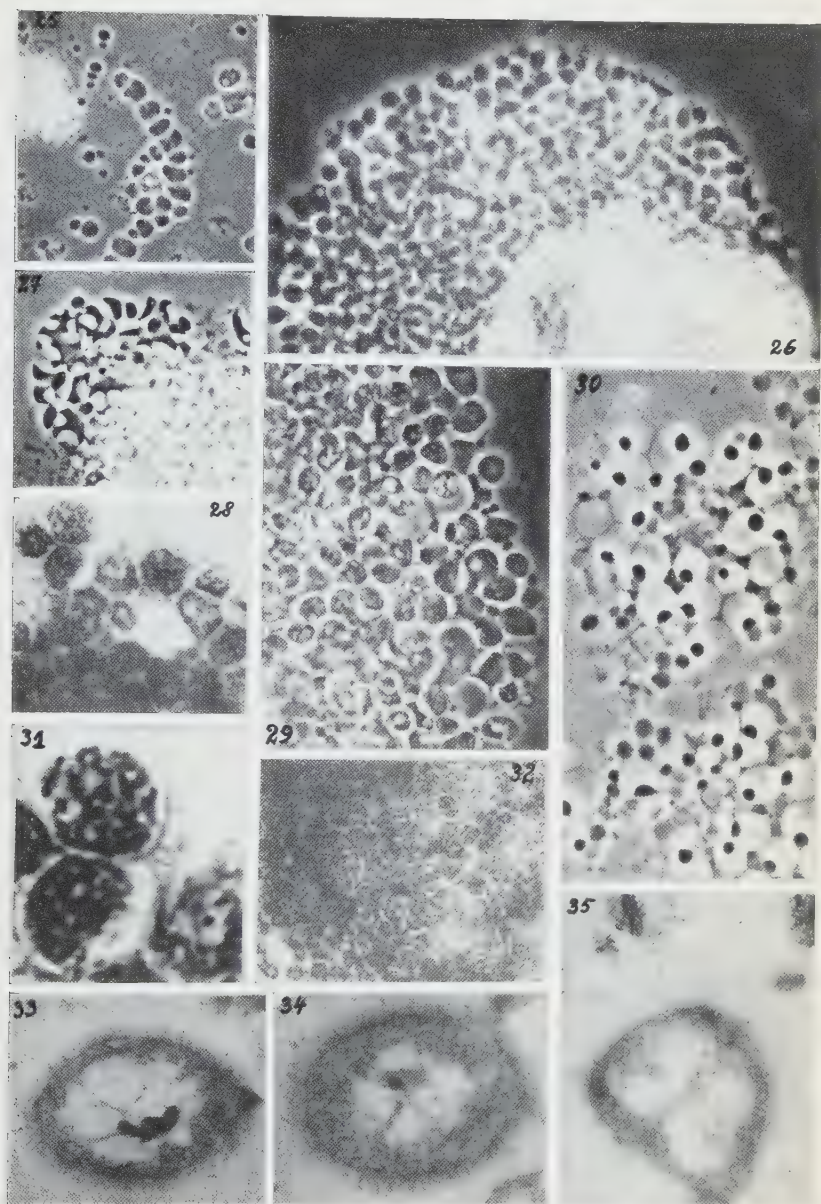


PLANCHE II.

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS



l'avons indiqué précédemment (pl. I, fig. 11 à 20). Les filaments, qui ont été souvent signalés dans les cultures de formes L, sont formés par des chapelets de formes naines reliées entre elles par la substance visqueuse, et résultent de l'étirement des corps globuleux, provoqué, soit artificiellement par la manipulation des colonies, soit naturellement, par les courants produits dans le milieu par des modifications physiques, en particulier par la dessiccation.

Les formes L du type A, représentées par des granulations mal limitées dont les plus petites ont environ 250 m $\mu$ , c'est-à-dire à peu près les dimensions des noyaux bactériens normaux, dans lesquelles on ne peut plus mettre en évidence d'acide D. A. P., incapables d'adsorber les phages, mais encore susceptibles de se diviser par division directe, semblent bien être des bactéries qui ont perdu, en même temps que la totalité de leur paroi, une fraction de leur cytoplasme, mais qui ont, par contre, conservé l'intégralité de leur noyau. L'absence de paroi, chez les formes naines, ne veut pas nécessairement dire que celles-ci sont dépourvues de toute enveloppe, mais nous sommes encore réduits aux hypothèses sur la nature de la limitante de ces organismes. Parmi les diverses possibilités qui s'offrent à l'esprit, la plus vraisemblable est que la membrane cytoplasmique, qui se trouve habituellement sous la paroi chez les bactéries normales, persiste en partie ou en totalité et peut être synthétisée par la forme naine. Certaines images de formes naines, observées en coupes ultra-fines au microscope électronique, semblent étayer cette hypothèse (pl. II, fig. 33, 34, 35).

#### CONDITIONS D'APPARITION DES TYPES A ET B DES FORMES L.

Les colonies A et B peuvent apparaître simultanément sur un même milieu. Il en est ainsi, par exemple, lorsqu'on ensemence des *Proteus* sur un milieu solide contenant du sérum et de la pénicilline. Dans ces conditions, les premières cultures contiennent des colonies A, des colonies B et des colonies mixtes ayant le plus souvent l'aspect morphologique des colonies B, mais qui sont constituées par un mélange des éléments des colonies A (formes naines, corps globuleux du type A) et des colonies B (corps globuleux organisés, susceptibles de réverser). Au cours des repiquages sur le même milieu contenant du sérum, les colonies B disparaissent progressivement et laissent la place aux seules colonies A. Le sérum ou un de ses constituants, facteur indispensable pour la reproduction des formes naines, semble être un facteur inhibiteur à plus ou moins brève échéance, pour les corps globuleux organisés qui constituent les colonies B.



Un certain nombre d'auteurs considèrent que l'irréversibilité des formes L du type A vers les bactéries d'origine n'est pas immédiate, mais qu'elle est progressive et qu'elle n'apparaît que lentement au cours des repiquages plus ou moins nombreux auxquels est soumise la souche. Nous pensons, au contraire, avec Taubeneck [19] et d'autres auteurs, que les formes L du type A, irréversibles, se constituent d'emblée, dès la première culture. Les réversions constatées par les chercheurs sont dues, soit à la présence de corps globuleux du type B dans les colonies A, soit à la présence, pendant un certain temps dans les cultures, de bactéries non transformées par l'agent inducteur, mais qui restent en vie latente et qui sont susceptibles de reprendre leur vie habituelle, donc de se multiplier, lorsque l'agent inducteur disparaît. Ces bactéries, transportées pendant un certain temps au cours des repiquages, seraient analogues aux « persisters » qui ont été signalés dans les organes de mammifères soumis à l'action des antibiotiques. Des expériences en cours, qui demandent encore à être confirmées, semblent nous apporter un argument en faveur de cette thèse. Nous aurons l'occasion d'y revenir par ailleurs.

Dans certaines conditions, les formes L du type B peuvent donner naissance à des formes L du type A. Si, par exemple, nous ensemençons des colonies B pures entretenues sur un milieu sans sérum, sur un milieu contenant du sérum, des colonies A tout à fait classiques, dont les éléments constitutifs ont pris tous les caractères des formes L du type A, y compris bien entendu l'irréversibilité, apparaîtront sur le milieu. Nous n'avons, par contre, jamais réussi le passage inverse du type A vers le type B, et rien dans la littérature ne nous indique que ce passage ait jamais pu être réalisé.

De très nombreuses espèces bactériennes ont donné naissance, dans des milieux appropriés, à des formes L du type B sans qu'apparaissent des formes L du type A. On peut même dire que c'est le cas le plus fréquent. Malheureusement, le plus souvent les auteurs rapportent seulement avoir transformé telle ou telle bactérie en formes L, sans en indiquer le type.

Bien que la possibilité en existe, les bactéries fournissent rarement d'emblée des formes L exclusivement du type A. Nous n'avons, jusqu'ici, observé ce fait dans notre service qu'avec quelques souches de colibacille.

#### LIMITES DE LA NOTION DE FORMES L.

Nous venons de décrire les caractéristiques et les principales propriétés des formes L chez les *Proteus*. Mais, ce serait une erreur de croire que toutes les formes L provenant de bactéries très diverses, induites par des méthodes variées ou cultivées sur

des milieux de composition très différente, puissent venir s'inscrire automatiquement dans le cadre relativement étroit dans lequel nous avons enfermé les formes L des *Proteus*.

Déjà chez les *Proteus*, spontanément sur un même milieu de culture ou artificiellement, à la faveur de modifications diverses apportées aux méthodes habituelles de travail, on peut observer l'apparition de colonies L dont les caractères et le comportement ne restent pas toujours parfaitement dans les limites que nous avons tracées pour les types A et B des formes L.

Pour les espèces autres que les *Proteus*, il semble que chaque forme L possède, comme les bactéries qui lui ont donné naissance, une personnalité qui se traduit par des caractères et des propriétés particulières.

La nature et la répartition des substances chimiques, constituant la paroi des bactéries, jouent certainement un rôle dans le comportement général des formes L qui en dérivent. Ainsi il est vraisemblable que les formes L provenant de bactéries à Gram (+) et à Gram (—), dont la paroi est si différente, ne sont pas identiques, malgré leur apparente similitude. On peut, d'autre part, difficilement concevoir que les formes L d'une même bactérie, obtenues grâce à des agents inducteurs tels que la pénicilline, des acides aminés comme la glycine ou la méthionine (pl. II, fig. 30), les anticorps, le froid, les rayons X, dont les effets sur la paroi bactérienne ne sont certainement pas identiques, puissent être absolument semblables. Le même raisonnement est d'ailleurs valable lorsqu'on considère des formes L d'une même bactérie, obtenues et conservées, soit sur un milieu isotonique, soit sur un milieu hypertonique.

Indépendamment des deux types que nous avons décrits, il doit donc exister une très grande variété de formes L correspondant non seulement aux différentes espèces bactériennes qui ont été transformées, mais aussi, pour une même espèce, à la façon dont elles ont été obtenues ou conservées. Chacune de ces variétés possède ses caractères propres, en rapport avec les modifications plus ou moins profondes de sa paroi.

Pour arriver à grouper cette infinité de formes L, il va falloir adopter, en attendant de mieux connaître chaque variété, une définition assez large de l'ensemble des formes L, qui pourrait être la suivante : *éléments globuleux, issus de bactéries dont la paroi a été modifiée ou éliminée complètement par des facteurs divers, et susceptibles de se multiplier sur des milieux solides en donnant naissance à des colonies.*

Cette définition, très large, permettrait d'exclure des formes L les éléments isolés dont nous avons fait mention au début de notre exposé et les protoplastes qui ne se reproduisent pas sur

les milieux solides ; elle permettrait d'englober toutes les formes L connues jusqu'à présent, quel qu'en soit le mode de préparation et quel qu'en soit le type, les sphéroplastes de Weibull et les formes globuleuses non réversibles, dont nous avons signalé l'existence. Elle permettrait certainement, sans modification, de faire rentrer dans ses limites les formes L qui restent à découvrir.

#### RÉSUMÉ.

L'introduction en bactériologie de termes nouveaux, tels que protoplastes et sphéroplastes, désignant des organismes globuleux issus des bactéries soumises à des influences diverses, risque d'apporter de nouveaux motifs de confusion dans le problème déjà complexe des formes et des bactéries.

Il faut donc essayer de tracer les limites qu'il faut attribuer à ces différents organismes. Compte tenu de l'ensemble de nos connaissances actuelles sur ce problème, nous proposons les définitions suivantes.

*Protoplastes* : Organismes globuleux, issus des bactéries, dont l'absence totale de paroi est démontrée, ne se divisant pas sur des milieux solides et incapables de reproduire les bactéries d'origine.

*Formes L des bactéries* (définition générale) : Eléments globuleux, issus des bactéries dont la paroi a été modifiée ou éliminée complètement par des facteurs divers, susceptibles de se multiplier sur des milieux solides en donnant naissance à des colonies.

*Formes L du type B* (sphéroplast) : Eléments globuleux, issus de bactéries, paroi provisoirement incomplète, capables de se multiplier sur des milieux solides, susceptibles de reverser vers les bactéries d'origine lorsque l'agent inducteur a disparu.

*Formes L du type A* : Eléments globuleux issus de bactéries, absence complète de paroi, capables de se multiplier sur des milieux solides, ne possédant plus les facteurs nécessaires pour reconstituer les bactéries d'origine.

Le tableau suivant fait ressortir les principaux caractères des organismes considérés.

	PAROI —	MULTIPLICATION SUR MILIEUX SOLIDES —	REVERSION —
Protoplastes .....	O	O	O
Formes L type B (Sphéroplast) .....	incomplète	+	+
Formes L type A .....	O	+	()

## SUMMARY

DELIMITATION OF THE NOTION OF BACTERIAL L FORMS :  
PROTOPLASTS, SPHEROPLASTS AND L FORMS.

The introduction in bacteriology of new words, such as protoplasts and spheroplasts, applying to spherical bodies resulting from bacteria submitted to various influences, might be a source of confusion in the already complex problem of bacterial forms.

The significance of these different words must therefore be delimited. In agreement with the to-day knowledge, the authors propose the following definitions :

*Protoplasts* : Spherical bodies issued from bacteria, completely deprived of cell-walls, which do not divide on solid media and are unable of reversion to the original bacteria.

*L forms of bacteria* (a general definition) : Spherical bodies resulting from bacteria the cell-wall of which has been modified or completely destroyed by various agents ; they may multiply and yield colonies on solid media.

*L forms of type B* (spheroplasts) : Spherical bodies issued from bacteria, with temporarily incomplete cell-walls, multiplying on solid media, able of reversion to the original bacteria when the inducing agent has disappeared.

*L forms of type A* : Spherical bodies issued from bacteria, completely deprived of cell-walls, multiplying on solid media, having lost the factors necessary to reconstitute the original bacteria.

The following table shows the main properties of these organisms.

	CELL-WALL —	MULTIPLICATION ON SOLID MEDIA —	REVERSION —
Protoplasts .....	O	O	O
L forms of type B (spheroplasts) .....	incomplete	+	+
L forms of type A .....	O	+	O

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] TULASNE (R.). *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 223.
- [2] KLIENEBERGER-NOBEL (E.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 77.
- [3] DIENES (L.) et WEINBERGER (H. J.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 245

- [4] WEIBULL (C.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 688.
- [5] SALTON (M. R. J.) in *Bacterial anatomy*, Cambridge University Press, 1956 ; in *The bacteria*, Academic Press, 1960.
- [6] WILKINSON (J. F.). *Bact. Rev.*, 1958, **22**, 46.
- [7] LEDERBERG (J.) et ST CLAIR (J.). *J. Bact.*, 1958, **75**, 143.
- [8] BRENNER (S.) et coll. *Nature*, 1958, **81**, 1713.
- [9] MCQUILLEN (K.) in *Bacterial anatomy*, Cambridge University Press, 1956.
- [10] TAUBENECK (U.) et BOHNE (H.). *Z. Naturforsch.*, 1958, **13**, 471.
- [11] TULASNE (R.) et LAVILLAUREIX (J.). *Schw. Z. allg. Pathol.*, 1957, **20**, 608.
- [12] TULASNE (R.). *Biol. méd.*, 1955, **44**, 1.
- [13] KANDLER (O.) et KANDLER (G.). *Z. Naturf.*, 1956, **11**, 252.
- [14] MINCK (R.), KIRN (A.) et M<sup>me</sup> GALLERON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 791.
- [15] CASSEL W. A. et HUTCHINSON (W. G.). *Exp. Cell. Res.*, 1954, **6**, 134.
- [16] MINCK (R.) et KIRN (A.). *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 1960, **79**, 658.
- [17] KANDLER (O.), HUND (A.) et ZCHENDER (C.). *Nature*, 1958, **181**, 572.
- [18] KANDLER (O.) et KANDLER (G.). *Erg. Mikrob.*, 1960, **33**, 7.
- [19] TAUBENECK (U.) et SCHUMANN (E.). *Zbl. Bakt. II Abt.*, 1959, **113**, 60.
- [20] KELLENBERGER (E.), LIEBERMEISTER (K.) et BONIFAS (V.). *Z. Naturforsch.*, 1956, **11**, 206.
- [21] TULASNE (R.) et LAVILLAUREIX (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 2396.
- [22] GUILLAUME (S.). (Communication personnelle).



**COMPARAISON DU POUVOIR BACTÉRICIDE  
DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES  
AU SEIN DU GROUPE ÉRYTHROMYCINE-SPIRAMYCINE-  
CARBOMYCINE-OLÉANDOMYCINE  
SUR LES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES.**

par R. CLUZEL, M. VERNER, R. VAURS et M. CLUZEL-NIGAY (\*).

*(Laboratoire de Bactériologie et Hygiène, Faculté de Médecine  
et Pharmacie, Clermont-Ferrand.)*

L'importance croissante des staphylocoques pathogènes en pathologie infectieuse est à l'heure actuelle bien reconnue. Cette notion est manifeste lorsqu'on examine la répartition des souches isolées systématiquement d'infections humaines [47]. De plus, la sensibilité de ces germes aux antibiotiques est en général relativement restreinte [21], et l'on sait toute la valeur du pouvoir bactéricide [20] d'un antibiotique ou d'une association d'antibiotiques dans les affections monomicrobiennes chroniques comportant des foyers où les défenses de l'organisme jouent un rôle limité [3]. C'est à l'étude du pouvoir bactéricide des associations d'antibiotiques que nous nous sommes particulièrement intéressés.

Lors de précédentes recherches [6, 7], l'un d'entre nous avait constaté fortuitement un effet bactéricide favorable de l'association érythromycine-oléandomycine sur les staphylocoques pathogènes. Nous avons cherché à savoir s'il s'agissait là, d'une part d'un fait susceptible d'être généralisé à toutes les souches de cette espèce, d'autre part d'un résultat commun à toutes les associations au sein du groupe érythromycine-spiramycine-carbomycine-oléandomycine. En effet, la résistance croisée [2, 13, 14, 16, 18, 19, 22, 23, 24] dans ce groupe d'antibiotiques, bien que non absolue [1, 11, 12, 15], est suffisamment établie pour qu'il soit logique d'admettre une analogie d'action étroite entre ces quatre antibiotiques. Ceci devrait permettre, semble-t-il, leur remplacement réciproque sans qu'il y ait bénéfice à utiliser telle combinaison de deux

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 juillet 1960.

antibiotiques de ce groupe plutôt que telle autre. C'est en effet ce qui se passe pour le groupe des tétracyclines. Nous nous sommes donc attachés à la comparaison du pouvoir bactéricide des six associations d'antibiotiques possibles entre érythromycine (E), spiramycine (Sr), carbomycine (Cm), oléandomycine Ol) sur 12 souches de staphylocoques pathogènes sensibles à ces différents antibiotiques.

Une partie de nos expériences a été faite suivant la technique du transfert sur cellophane [4], l'autre ayant été réalisée plus



FIG. 1.

rapidement par un procédé que nous avons récemment mis au point [8] : « la disposition en croix », dérivée du transfert sur cellophane.

Le principe de ces deux méthodes est le même. Nous le rappelons brièvement : on fait diffuser préalablement les antibiotiques dans une gélose de base à partir de bandes de papier ; on applique ensuite sur cette gélose un tambour de cellophane dont onensemence l'intérieur avec la souche à étudier. Les antibiotiques traversent la cellophane et agissent sur les germes. Après un temps de contact variant de six à vingt-quatre heures, on enlève le tambour et on l'applique sur une gélose sans antibiotique. Les bactéries survivant à l'action de l'antibiotique sont

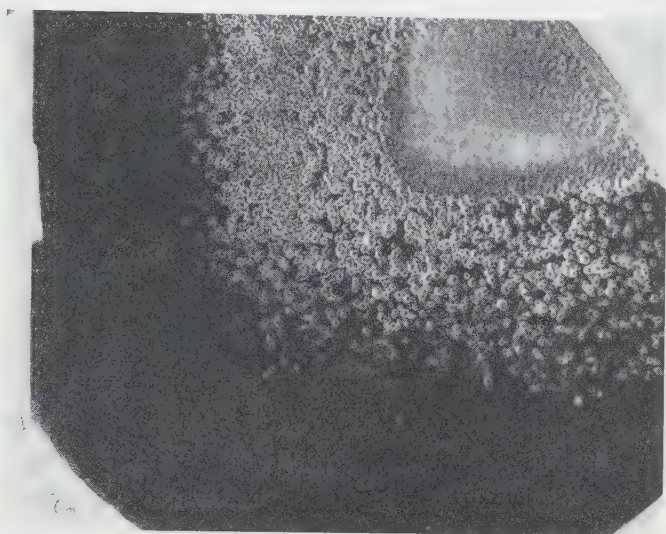


FIG. 2.



FIG. 3.

capables de pousser à nouveau. Les résultats sont facilement conservés par des photographies du tambour de cellophane.

Les bandes imprégnées d'antibiotiques ont été préparées à l'aide des solutions suivantes :

$$\begin{aligned} E &= 300 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \\ \text{Sr} &= 1\,500 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Cm} &= 800 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \\ \text{Ol} &= 800 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \end{aligned}$$

L'interprétation des résultats de ces méthodes est assez connue pour que nous n'entrions pas dans le détail. Les conclusions de nos expériences seront donc très simplement désignées par : antagonisme (fig. 1), indifférence (fig. 2) ou synergie (fig. 3) et rassemblées dans le tableau I.

TABLEAU I.

NOM DE LA SOUCHE	SENSIBLE A	ASSOCIATIONS RÉALISÉES	RÉSULTATS
Ma...	P. B. S. N. F. Po. A. O. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr E-Cm E-Ol Sr-Cm Sr-Ol Cm-Ol	Synergie Indifférence Synergie Synergie Synergie Indifférence
Pe...	B. N. F. C. Po. A. O. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr E-Cm E-Ol Sr-Cm Sr-Ol Cm-Ol	Indifférence Antagonisme Synergie Synergie Antagonisme Indifférence
Ch...	N. F. C. A. O. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr E-Cm E-Ol Sr-Cm Sr-Ol Cm-Ol	Indifférence Indifférence Synergie Indifférence Indifférence Indifférence
Er...	P. N. F. C. A. T. O. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr E-Cm E-Ol Sr-Cm Sr-Ol Cm-Ol	Indifférence Indifférence Synergie Indifférence Indifférence Indifférence
Gr...	B. N. F. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr E-Cm E-Ol Sr-Cm Sr-Ol Cm-Ol	Indifférence Synergie Synergie Indifférence Antagonisme Indifférence

TABLEAU I (suite).

NOM DE LA SOUCHE	SENSIBLE A	ASSOCIATIONS RÉALISÉES	RÉSULTATS
Fo... ..	B. N. F. C. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr	Synergie
		E-Cm	Synergie
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Indifférence
		Sr-Ol	Synergie
		Cm-Ol	Indifférence
Du... ..	B. N. F. C. E. Sr. Cm. Ol.	E-Sr	Synergie
		E-Cm	Indifférence
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Synergie
		Sr-Ol	Synergie
		Cm-Ol	Synergie
Br... ..	B. N. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr	Synergie
		E-Cm	Synergie
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Synergie
		Sr-Ol	Synergie
		Cm-Ol	Synergie
De... ..	B. N. F. E. Sr. Cm. Ol.	E-Sr	Indifférence
		E-Cm	Indifférence
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Synergie
		Sr-Ol	Synergie
		Cm-Ol	Synergie
Me... ..	B. N. F. A. O. E. Sr. Cm. Ol.	E-Sr	Indifférence
		E-Cm	Indifférence
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Antagonisme
		Sr-Ol	Indifférence
		Cm-Ol	Indifférence
Gi... ..	B. N. F. C. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr	Synergie
		E-Cm	Synergie
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Synergie
		Sr-Ol	Synergie
		Cm-Ol	Indifférence
Ch... ..	B. N. F. A. O. E. Sr. Cm. Ol. No.	E-Sr	Synergie
		E-Cm	Synergie
		E-Ol	Synergie
		Sr-Cm	Indifférence
		Sr-Ol	Indifférence
		Cm-Ol	Indifférence

Si nous groupons les effets de ces 72 associations en fonction de chacun des six types de combinaisons possibles (tableau II), nous remarquons que l'antagonisme est un phéno-



TABLEAU II.

ASSOCIATIONS	ANTAGONISME	INDIFFÉRENCE	SYNERGIE
E-Sr .....	0	6	6
E-Cm .....	1	6	5
E-Ol .....	0	0	12
Sr-Cm .....	1	5	6
Sr-Ol .....	2	4	6
Cm-Ol .....	0	9	3
Résultats .....	4	30	38

mène rare (4 sur 72), que l'indifférence se rencontre trente fois sur soixante-douze et que la synergie est fréquente : 38 sur 72, notion classique que notre expérimentation vient confirmer [9, 10]. Cependant, et c'est là le point capital sur lequel nous voulons particulièrement insister, alors que la résistance croisée devrait exclure toute association préférentielle entre les antibiotiques de ce groupe, nous constatons que l'association E-Ol a un résultat synergique douze fois sur douze, c'est-à-dire dans 100 p. 100 des cas, alors que les meilleures des autres combinaisons possibles (E-Sr, Sr-Cm et Sr-Ol) ne sont favorables que dans la moitié des cas soit 6 sur 12. Les résultats les moins bons sont donnés par E-Cm (5 sur 12) et Cm-Ol (3 sur 12).

Il semble donc que l'association E-Ol soit tout spécialement intéressante, quant à son action sur les staphylocoques pathogènes. Comme nous l'avons dit au début de ce travail, ce fait constaté expérimentalement avait déjà attiré notre attention. C'est pourquoi il importait, dans ce groupe comprenant des antibiotiques d'action très voisine, d'essayer d'apporter la preuve qu'il s'agissait d'un phénomène particulier à l'association E-Ol et non d'un simple effet d'addition (limite inférieure de la synergie) auquel on était en droit de s'attendre pour toutes les différentes combinaisons entre les antibiotiques de ce groupe, qui, nous le savons, présentent un spectre antibactérien très voisin. De plus, nous tenons à souligner le pouvoir bactéricide en valeur absolue de l'association E-Ol, qui, bien que difficile à chiffrer mathématiquement par cette méthode, n'en est pas moins évident (fig. 3).

D'autres auteurs [17], utilisant une technique différente (en milieu liquide [5]), viennent de rapporter récemment les résultats de leurs expériences qui ont porté sur 124 souches de staphylocoques pathogènes. Ils démontrent l'effet bactéricide *in vitro* des associations entre l'érythromycine et des antibiotiques comme la néomycine, la tétracycline, le chloramphénicol, tout en insistant sur le fait que cet effet est imprévisible.

Au terme de ce travail, nous voudrions rappeler que nos expé-

riences ont été faites avec des souches de staphylocoques pathogènes sensibles aux quatre antibiotiques envisagés. D'autre part il est établi que chaque souche bactérienne présente un comportement particulier vis-à-vis de l'éventail des antibiotiques. Ceci justifie donc les nombreux tests de bactériostase et de bactéricidie effectués journellement. L'ensemble de ces considérations souligne donc, si cela était nécessaire, le grand intérêt qui s'attache à l'existence d'un effet synergique *in vitro* de l'association érythromycine-oléandomycine sur des staphylocoques pathogènes. Nous nous garderons toutefois d'extrapoler ces résultats à tous les staphylocoques pathogènes que l'on peut isoler de prélèvements pathologiques humains, en soulignant bien que cette association semble particulièrement efficace *in vitro* sur des souches de staphylocoques pathogènes sensibles aux antibiotiques du groupe étudié. Il reste évidemment à faire la preuve de l'existence d'un tel phénomène *in vivo*.

#### RÉSUMÉ.

L'intérêt de l'étude du pouvoir bactéricide des antibiotiques, isolés ou associés, est maintenant reconnu dans l'orientation de toute antibiothérapie. Les auteurs rapportent leurs expériences effectuées par la technique du transfert sur cellophane et par une méthode dérivée, la disposition en croix, sur 12 souches de staphylocoques pathogènes sensibles entre autres à l'érythromycine, à la spiramycine, à la carbomycine et à l'oléandomycine. Pour chacun de ces germes ont été réalisées les six combinaisons possibles deux par deux, entre ces quatre antibiotiques. L'analyse des résultats montre une synergie du couple érythromycine-oléandomycine dans tous les cas, tandis que les autres associations sont moins favorables.

#### SUMMARY

COMPARISON OF THE BACTERICIDAL POWER OF ANTIBIOTIC ASSOCIATIONS WITHIN THE ERYTHRO-SPIRA-CARBO-OLEANDO GROUP ON THE PATHOGENIC STAPHYLOCOCCI.

The interest of studying the bactericidal power of antibiotics, isolated or associated, in the orientation of every antibiotherapy is now acknowledged. The authors report the experiments they have carried out with the technique of transfer on cellophane and a derived method, cross disposition, on twelve strains of pathogenic staphylococci sensitive, among other products, to erythromycin, spiramycin, carbomycin and oleandomycin. For each of these microorganisms, the six possible two by two combinations

have been realized between these four antibiotics. The analysis of the results shows a synergy of the couple erythromycin-oleandomycin in all the cases, whereas the other associations are less favourable.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRIEU (G.), MONNIER (J.) et BOURSE (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1958, **152**, 870-874.
- [2] BARTOLOZZI (G.), ACOCELLA (M.) et PANERO (C.). *Riv. Clin. Pediat.*, 1957, **59**, 339-351.
- [3] CHABBERT (Y.). Coll. III/8 in *Huit colloques de Biologie clinique, III<sup>e</sup> Congrès intern. Biologie clinique*. Bruxelles, juillet 1957, 141-188. Presses Académiques Européennes, Bruxelles, 1958.
- [4] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 289-299.
- [5] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 122-125.
- [6] CLUZEL (R.). *Thèse Médecine*, Clermond-Ferrand, 1958.
- [7] CLUZEL (R.), GRAS (H.), VAURS (R.) et CLUZEL-NIGAY (M.). *Sem. Hôp. Paris*, 1959, **1**, 46.
- [8] CLUZEL (R.), VAURS (R.), CLUZEL-NIGAY (M.) et VERNER (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 928-932.
- [9] ELLIOTT (H. J.) et HALL (W. H.). *J. Lab. clin. Med.*, 1957, **50**, 242-249.
- [10] ELLIOTT (H. J.) et HALL (W. H.). *Antibiot. Annual* 1956-1957, 596-600.
- [11] ENGLISH (A. R.). *Antibiot. Annual*, 1957-1958, 756-759.
- [12] GARROD (L. P.) et WATERWORTH (P. M.). *Brit. med. J.*, 14 juillet 1956, 61-65.
- [13] HSIE (J. Y.), KOTZ (R.) et NUSSE (W.). *Antibiot. Annual*, 1955-1956, 773-777.
- [14] HSIE (J. Y.), KOTZ (R.), NUSSE (W.) et FRIEMAN (E.). *Antibiot. Annual*, 1956-1957, 185-190.
- [15] HSIE (J. Y.), NUSSE (W.), EPSTEIN (S.) et coll. *Antibiot. Chemo-ther.*, 1958, **8**, 607-614.
- [16] JONES (W. F. Jr), NICHOLS (R. L.) et FINLAND (M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **93**, 388-393.
- [17] LINZ (R.), LECOQ (E.) et MANDELBAUM (E.). *Sem. Hôp. (Thérapeutique)* 1960, **36**, 302-309.
- [18] LUTZ (A.), GROOTEN (O.) et HOFFERER (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 778-789.
- [19] LUTZ (A.) et HOFFERER (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 616-623 et 705-710.
- [20] MARTIN (R.) et SUREAU (B.). *Rev. Pratic.*, 1957, **7**, 1303-1310.
- [21] PECORI (V.), CIMINO (R.), MAZZACCA (G.), ALTUCEI (P.) et TROISI (E.). *G. Mal. infett. parassit.*, 1957, **9**, 477-482.
- [22] PINNERT SINDICO (S.) et PELLERAT (J.). *Thérapie*, 1956, **11**, 308-323.
- [23] RANTZ (L. A.), RANDALL (E.), THUM (L.) et BARKER (L. F.). *Antibiot. Chemother.*, 1957, **7**, 399-409.
- [24] ROSS (S.). *Antibiot. Annual*, 1955-1956, 600-603.

## PRÉSENCE DANS LE SÉRUM HUMAIN D'HÉTÉROAGGLUTININES SPÉCIFIQUES DES ANTIGÈNES A ET C DU CHEVAL.

par M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK (\*).

*(Centre d'Etude des Groupes Sanguins des Animaux,  
Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins,  
Institut Pasteur)*

L'existence de réactions croisées dans le domaine des groupes sanguins de l'homme et des animaux a été signalée par de nombreux auteurs [1, 3].

En ce qui concerne les systèmes des groupes sanguins de l'homme et du cheval, Herman [2] en 1936, en absorbant le sérum des chevaux par des globules rouges d'homme et le sérum d'homme par les globules rouges de cheval, a conclu qu'il existe de nombreuses similitudes dans les agglutinines et les antigènes érythrocytaires de l'homme et du cheval.

Cependant nous n'avons pas observé de communauté antigénique entre les facteurs érythrocytaires humains A et B et ceux du cheval [4].

Nous avons, par contre, constaté la présence dans le sérum humain d'agglutinines spécifiques de certains facteurs érythrocytaires du cheval, à savoir : A et C. Ceux-ci sont les plus fréquents chez les chevaux de France. La fréquence du facteur C est de 86 p. 100, celle du facteur A de 75 p. 100.

Lors d'études antérieures nous avons décelé dans le sérum d'âne des hétéroagglutinines spécifiques de certains facteurs érythrocytaires équins, surtout du D [4, 5]. Cheval et âne appartenant à la même famille zoologique, équidés, le fait de l'existence dans le sérum d'âne d'agglutinines équines ne nous a pas paru surprenant, bien que les facteurs équins n'existent pas dans la structure antigénique globulaire asine.

La découverte dans le sérum d'homme d'hétéroagglutinines spécifiques de caractères érythrocytaires équins (atteignant parfois le titre 2 000) nous a paru intéressante et méritant une analyse plus approfondie.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 juillet 1960.

## I. — ETUDE SÉROLOGIQUE.

*Matériel.*

a) Les sérums humains proviennent du poste de transfusion de l'Institut Pasteur.

b) Les sangs des chevaux proviennent de l'Annexe de l'Institut Pasteur, à Garches.

*Techniques.*

a) *La réaction d'agglutination* est effectuée en tubes de Kahn, en mettant en contact 0,1 ml de sérum avec une goutte (0,05 ml) d'une suspension de globules rouges à 1 p. 100 dans l'eau physiologique.

Après trente minutes de contact à la température du laboratoire, on centrifuge pendant une minute à 1 000 tours/minute et on fait la lecture à l'aide d'un miroir concave.

b) *Le titrage de l'agglutinine* est effectué de la même manière sur une série de dilutions du sérum à examiner : 1/2, 1/4, 1/8, etc.

c) *L'absorption des agglutinines* se fait sur un sérum chauffé à 56° C pendant trente minutes, à l'aide de globules rouges (lavés préalablement quatre fois dans de l'eau physiologique). Le volume du culot globulaire utilisé dépend du taux des agglutinines à absorber. Le sérum reste en contact avec le culot globulaire pendant deux heures à la température du laboratoire et ensuite seize heures à 4° C. On centrifuge le mélange et on récupère le liquide surnageant, c'est-à-dire la fraction absorbée du sérum.

## RÉSULTATS.

Nous avons examiné le sérum de sujets sains appartenant à différents groupes sanguins du système ABO. Ces sérums contenaient des iso-agglutinines naturelles anti-A, anti-B ou anti-AB.

La recherche dans le sérum humain d'agglutinines spécifiques des facteurs érythrocytaires équins exige l'élimination d'hétéro-agglutinine d'espèce : cheval anti-homme. Celle-ci s'effectue par l'absorption du sérum humain à l'aide de globules rouges O du cheval.

Les hématies du cheval ne contenant dans leur structure antigénique aucun des facteurs érythrocytaires actuellement connus sont considérées comme appartenant au groupe sanguin O. Leur fréquence est très faible : de 1 à 2 p. 100 environ.

La fraction du sérum humain ainsi absorbée est mise en présence de plusieurs séries de divers échantillons globulaires équins d'un groupe sanguin connu.

A l'examen de 60 échantillons de sérum humain, nous avons constaté, dans 50 p. 100 des cas, la présence d'agglutinines spécifiques des facteurs érythrocytaires A et C du cheval. Nous avons



trouvé anti-C 24 fois : son titre varie de 1 à 512, 2 fois il atteignait 2 000. Anti-A titrant de 1 à 16 a été trouvé quatre fois et anti-AC deux fois.

Il faut souligner que le titre de l'isoagglutinine anti-C du cheval ne dépasse pas en général 32, tandis que le titre de l'hétéroagglutinine anti-C du cheval existant dans le sérum humain peut atteindre le chiffre de 2 000.

Il est difficile d'expliquer le phénomène de prépondérance de l'hétéroagglutinine anti-C du cheval dans le sérum humain. Un fait analogue a été constaté pour l'agglutinine anti-D du cheval dans le sérum d'âne [4].

La présence dans le sérum humain de ces anticorps décelant les facteurs A et C du cheval est indépendante de la présence des isoagglutinines naturelles anti-A et anti-B de l'homme.

Le sérum humain mis en contact avec des hématies du cheval de n'importe quel groupe conserve ses isoagglutinines naturelles anti-A ou anti-B à leur taux initial. On constate parfois une diminution du titre d'un tube (p. ex. de 256 à 128), ce qui est dû au processus d'absorption et de manipulation.

L'élimination des isoagglutinines anti-A et anti-B du sérum humain ne diminue pas l'activité sérologique des hétéroagglutinines spécifiques des facteurs érythrocytaires équins anti-A et anti-C.

Ces hétéroagglutinines sont thermolabiles ; elles sont entièrement détruites après le chauffage à 65° C pendant trente minutes.

Dans le tableau I nous présentons un exemple d'un sérum

TABLEAU I. — Etude du sérum « X ».

Globules rouges	B homme	O cheval	C cheval
sérum "X"	256	16	128
sérum "X" absorbé par les globules rouges:			
B homme	0	16	128
O cheval	128	0	64
C cheval	128	0	0

d'un sujet « X » appartenant au groupe sanguin A, qui contient une isoagglutinine anti-B titrant 256, une hétéroagglutinine anti-C de cheval titrant 128 et une hétéroagglutinine d'espèce (homme anti-cheval) titrant 16.

L'activité du sérum vis-à-vis des hématies O et C du cheval est conservée après l'absorption de son isoagglutinine anti-B. L'absorption de l'hétéroagglutinine équine laisse intacte l'activité de l'isoagglutinine humaine anti-B.

Le tableau II présente un exemple analogue d'un sérum d'un

TABLEAU II. — Etude du sérum « Y ».

Globules rouges	A homme	B homme	O cheval	C cheval
sérum "Y"	128	16	16	512
sérum "Y" absorbé par les globules rouges:				
A homme	0	8	16	256
B homme	64	0	16	512
O cheval	128	16	0	256
C cheval	128	16	0	0

sujet « Y » appartenant au groupe sanguin O. Il contient des isoagglutinines anti-A et anti-B titrant respectivement 128 et 16, une hétéroagglutinine anti-C de cheval titrant 512 et une hétéroagglutinine d'espèce (homme anti-cheval) titrant 16.

Le tableau III présente le sérum d'un sujet « Z » appartenant

TABLEAU III. — Etude du sérum « Z ».

Globules rouges	A homme	O cheval	A cheval
sérum "Z"	64	4	16
sérum "Z" absorbé par les globules rouges:			
A homme	0	4	16
O cheval	64	0	16
A cheval	64	0	0

au groupe sanguin B, qui contient une isoagglutinine anti-A titrant 64, une hétéroagglutinine anti-A de cheval titrant 16 et une hétéroagglutinine d'espèce titrant 4.

Le sérum du sujet « V » contenant une hétéroagglutinine anti-C équine (d'un titre 2 000) contenait également un anticorps anti-Rh sous forme incomplète, titrant 128 vis-à-vis des globules rouges traités par la papaïne.

La présence d'anti-C équin dans le sérum humain ne dépend pas de la présence d'anti-Rh, ce que montre le tableau IV. L'absorption de ce sérum par les hématies C de cheval ne diminue pas l'activité du sérum examiné vis-à-vis des hématies papainées. D'autre part l'absorption par les hématies O Rh + n'influence pas l'activité de l'hétéroagglutinine anti-C de cheval.

Ainsi nous avons constaté au cours de l'étude sérologique que

TABLEAU IV. — Etude du sérum « V ».

Globules rouges	O Rh + papainés	C cheval
sérum "V"	128	2000
sérum "V" absorbé par les globules rouges:		
O Rh + papainés	0	1000
C cheval	64	0

les hétéro-anticorps spécifiques des facteurs érythrocytaires A et C du cheval existent dans le sérum humain, indépendamment de la présence des isoagglutinines naturelles anti-A, anti-B et anti-Rh.

## II. — ETUDE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE.

Nous avons essayé de localiser ces agglutinines anti-facteur érythrocytaire C du cheval par l'électrophorèse en gélose et de voir si leur mobilité est différente de celle des isoagglutinines naturelles humaines.

Les hétéroagglutinines anti-A de cheval ayant un titre assez faible (ne dépassant pas 16) ne pouvaient pas être étudiés par immuno-électrophorèse.

### TECHNIQUES.

Une analyse immuno-électrophorétique, selon le principe décrit par Grabar et Williams, a été faite en gel de gélose à 1 p. 100, en tampon véronal sodique de pH 8,2 de force ionique  $\mu$  0,05. La durée du passage du courant est de deux heures avec 5-6 V/cm, pour une plaque de gélose de  $12 \times 17$  cm<sup>2</sup>.

Pour localiser l'activité sérologique des fractions du sérum humain, on découpe les plaques de gélose, immédiatement après la migration, en bandelettes d'une largeur de 0,25 cm. Ces bandelettes, représentant toutes les fractions du sérum, sont mises dans des tubes et on ajoute dans chaque tube 0,25 ml de NaCl à 2 p. 100. Ensuite on congèle les fractions à  $-20^{\circ}$  C. Le lendemain on les dégèle brusquement en les

plongeant dans un bain-marie à 37° C. Après quinze minutes de centrifugation à 5 000 tours/minute on récupère les éluats qui sont soumis à une étude sérologique. Les tubes contenant les éluats sont numérotés à partir de la zone de départ (la cuve, qui est désignée par zéro) — 1, — 2, — 3, etc., vers la cathode, + 1, + 2, + 3, etc., vers l'anode.

Pour repérer l'emplacement des fractions on dispose, sur le bord de la plaque, du sérum normal qui est soumis à une étude immuno-électrophorétique avec un immunsérum de cheval antisérum humain normal.

Les éluats sont testés vis-à-vis de globules rouges C de cheval et de globules rouges humains A et B, selon le cas. Les éluats des fractions actives (ayant un pouvoir agglutinant) sont soumis à une étude quantitative en déterminant le titre d'agglutinine.

### RÉSULTATS.

L'étendue de la zone où l'on constate la présence d'activité sérologique dépend de la qualité du sérum (taux de l'agglutinine), la quantité soumise à la migration étant toujours la même : 0,3 ml.

Trois sérums ont été étudiés (tableau V). Les isoagglutinines

TABLEAU V. — **Activité sérologique des éluats.**

Sérum	Globules rouges	Titre	Activité sérologique des éluats																		
			-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	0	+1	+2
N° 1	C cheval	512	-	I	4	4*	4	3	3	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B homme	128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	I	I	2	3*	2	I	-	
N° 2	C cheval	1000	-	-	-	I	2	2	2	3	4	4*	4	4	4	3	3	3	3	2	-
	B homme	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2*	-	-	-	
N° 3	C cheval	2000	-	-	-	-	2	4	4	4*	4	4	3	2	-	-	-	-	-	-	
	A homme	256	-	-	-	-	-	-	-	-	I	2	4	4	4	4	4*	4	4	3	2

— : absence d'agglutination ; 1, 2, 3, 4 : degrés d'agglutination ; \* : taux maximum de l'agglutinine.

naturelles humaines ont été retrouvées pour les sérums 1 et 3, respectivement dans des bandelettes de — 6 à 0, et de — 7 à + 1, avec leur maximum dans des bandelettes — 1 et — 2. Cette zone est la zone des  $\beta_2$ -globulines, comme cela a déjà été prouvé par les travaux de divers chercheurs.

En ce qui concerne les hétéroagglutinines anti-C de cheval, leur activité a été constatée dans des bandelettes de — 14 à + 1 selon le cas. Pour le n° 1, c'est la zone de — 14 à — 8 avec son

maximum dans la bandelette — 12 qui se trouve à 2 cm de la fin de la ligne de globulines  $\gamma$ , ce qui correspond au pic des globulines  $\gamma$ . Cependant, pour le n° 2 l'activité d'anti-C de cheval se trouve dans les bandelettes de — 12 à + 1 avec son maximum dans — 6. Pour le n° 3 elle a été constatée dans la zone des bandelettes de — 11 à — 4 avec son maximum dans — 8.

Nous voyons que l'activité de l'anti-C de cheval est localisée dans la zone des globulines  $\gamma$ , mais sa mobilité varie avec chaque cas étudié. On peut supposer que l'apparition de l'anti-C de cheval dans le sérum humain est le résultat d'une immunisation par un antigène quelconque, bactérien ou autre, répandu dans la nature, qui a une communauté antigénique avec le facteur globulaire C du cheval.

On sait que l'immunisation de lapins ou de chevaux par des antigènes bactériens provoque l'apparition d'anticorps qui, au début, sont situés dans les  $\gamma$ -globulines lentes. En augmentant la durée de l'immunisation on les trouve dans la zone des globulines  $\gamma$  de plus en plus rapides.

Les différentes localisations des trois anti-C équin, c'est-à-dire leurs différentes mobilités électrophorétiques, peuvent être expliquées par la durée plus ou moins longue d'immunisation de divers sujets par un antigène inconnu de nous, ayant une communauté antigénique avec le facteur érythrocytaire C du cheval.

#### CONCLUSION.

L'étude immuno-électrophorétique nous a permis de préciser la localisation des hétéroagglutinines spécifiques du facteur érythrocytaire C du cheval, qui sont situées dans la zone des globulines  $\gamma$  et celle des isoagglutinines naturelles anti-A et anti-B de l'homme dans la zone des globulines  $\beta_2$ .

Ainsi l'étude immuno-électrophorétique a confirmé l'indépendance, constatée au cours de l'étude sérologique, de ces deux types d'agglutinines existant dans le sérum humain.

#### RÉSUMÉ.

Nous avons mis en évidence dans 50 p. 100 des sérums humains étudiés la présence des hétéroagglutinines spécifiques des facteurs érythrocytaires A et C du cheval.

L'étude sérologique et immuno-électrophorétique nous a permis de constater leur indépendance des isoagglutinines naturelles humaines et leur localisation (dans l'électrophorèse sur gélose) dans la zone des globulines  $\gamma$ .



## SUMMARY

EXISTENCE IN HUMAN SERUM OF HETERO-AGGLUTININS SPECIFIC  
FOR HORSE A AND C ANTIGENS.

These agglutinins were demonstrated in 50 % of the sera studied.

The serologic and immuno-electrophoretic study shows that they differ from normal human iso-agglutinins and that they are localized (gel-electrophoresis) in the  $\gamma$  globulins zone.

★  
★★

Nous tenons à remercier vivement M. Nicol, Directeur de l'Annexe de l'Institut Pasteur à Garches, les docteurs-vétérinaires Girard et Corvazier, qui ont bien voulu nous fournir les échantillons de sang des chevaux.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et EYQUEM (A.). *Les groupes sanguins chez les animaux*. Edit. méd. Flammarion, Paris, 1953.
  - [2] HERMAN (V. A.). *J. Immunol.*, 1936, **31**, 347.
  - [3] JOYSEY (V. C.). *Brit. med. Bull.*, 1959, **15**, 158.
  - [4] PODLIACHOUK (L.). *Thèse doct. ès sc.*, Paris, 3 mai 1957.
  - [5] PODLIACHOUK (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 7.
-

# **L'ALLERGIE CUTANÉE**

## **DANS LA PSEUDO-TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE**

### **DU LAPIN (\*)**

par J.-R. HELLUY, E. de LAVERGNE, J.-C. BURDIN, J. SCHMITT  
et G. PERCEBOIS.

(Laboratoire de Bactériologie et Parasitologie.  
Faculté de Médecine de Nancy)

Parmi les méthodes biologiques permettant le diagnostic de la pseudo-tuberculose chez l'animal, outre l'isolement du germe et la recherche des anticorps humoraux, il faut rappeler l'intérêt de la mise en évidence de l'état d'allergie spécifique développé au cours de la maladie.

Depuis plusieurs années, l'allergie dans la pseudo-tuberculose expérimentale du lapin a retenu notre attention. Des travaux ont déjà été faits en ce domaine, mais, d'une part les antigènes préparés par différents auteurs pour mettre en évidence l'état d'allergie n'étant pas entièrement satisfaisants, nous avons été conduits à rechercher un nouvel antigène, d'autre part, nous désirions préciser certains points, tels que : la date d'apparition de l'allergie, l'existence ou non d'allergie croisée entre les différents types antigéniques de *C. pseudotuberculosis*, enfin l'existence ou non d'hétéro-allergie vis-à-vis d'autres membres importants de la famille des *Parvobacteriaceae*, à savoir : *P. septica*, *P. tularensis* et *Brucella*.

Nous venons de dire que certains auteurs avaient utilisé divers antigènes.

Bachman [1], le premier, en 1922, proposa un filtrat de culture de diverses souches de *C. pseudotuberculosis*, chauffé à 65°.

Dessy [2], en 1925, prit aussi un filtrat de culture, mais de germes ayant proliféré quinze jours en bouillon glyciné.

Saenz et Costil [3], en 1932, gênés par la survenue d'une épidémie de pseudo-tuberculose dans leur élevage de cobayes,

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1960.

s'efforcèrent de déceler les animaux malades par une réaction d'allergie. Ils cultivèrent à cet effet plusieurs souches de bacilles de Vignal et Malassez sur gélose. Après six jours ils préparèrent une suspension de ces germes en eau physiologique formolée à 3 p. 1 000, qu'ils laissèrent à l'étuve à 37° pendant quinze jours. Ramené à 1 cg de corps microbiens par millilitre, l'antigène était prêt à être employé.

En 1937, Boquet [4] utilisa pour ses intradermo-réactions une culture en bouillon, chauffée une heure à 60°, puis centrifugée et décantée. Cet auteur, ayant obtenu des réactions cutanées positives chez des animaux témoins apparemment indemnes de pseudo-tuberculose, estime « que de ce fait elles perdent une partie de leur valeur diagnostique ».

Communal [5], dans sa thèse de 1945, rapporte les essais entrepris pour mettre en évidence l'allergie chez des singes *M. rhesus* du jardin zoologique de Marseille, l'un d'entre eux étant mort de pseudo-tuberculose. L'injection intradermique de 0,1 ml d'une culture de bacilles de Vignal et Malassez, âgée de trois semaines et chauffée soixante minutes à 60°, se révéla négative, mais les singes morts quinze mois plus tard semblaient indemnes de la maladie.

Enfin Maraccini [6], ayant lui aussi constaté une épidémie dans son élevage de cobayes, proposa de reconnaître les animaux infectés par l'injection d'un filtrat de culture. L'auteur eut 80 p. 100 de résultats cutanés positifs, mais aucun de ces cobayes ne présentait de signe de maladie, et tous étaient vivants six mois plus tard. Ce qui permet de douter de la spécificité de sa réaction.

Nous voyons donc que les antigènes proposés pour mettre en évidence par intradermo-réaction l'allergie dans la pseudo-tuberculose animale sont : soit des corps microbiens ou des cultures de germes tués par le formol ou la chaleur, soit des filtrats de culture.

Or, les expérimentateurs qui ont utilisé ces différents antigènes reconnaissaient n'avoir pu obtenir de résultats satisfaisants. Nous-mêmes avons préparé les différentes sortes d'antigènes ainsi proposés : nous les avons injectés par voie dermique à 25 lapins neufs, c'est-à-dire à des animaux non malades, qui n'avaient pas été en contact avec des bêtes infectées et qui ne possédaient pas dans leur sérum d'agglutinines vis-à-vis de *C. pseudotuberculosis*, même à des taux bas ; nous avons constaté que la plupart de ces lapins témoins présentaient une intradermo-réaction positive. Il s'agissait donc de tests faussement positifs. La présence de protéines contenues dans les corps microbiens ou les filtrats de culture était responsable de ces phénomènes cutanés inflammatoires non spécifiques.

Aussi avons-nous cherché à préparer un autre antigène, susceptible de nous donner de meilleurs résultats. Et pour ce faire nous avons utilisé la technique dont s'était servi V. de Lavergne [7] pour préparer la tularine.

#### TECHNIQUE DE PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE.

Etant donné l'existence de 5 types antigéniques différents de *C. pseudotuberculosis*, nous avons préparé les 5 antigènes correspondants pour les intradermo-réactions (1).

Nous avons opéré comme suit : chacun des types de bacilles de Vignal et Malassez est ensemencé sur 10 tubes de gélose ordinaire et mis quarante-huit heures à 37°.

Les cultures sont alors émulsionnées en eau physiologique et placées en ballons capuchonnés durant vingt jours à 37°. Pendant ce temps-là, les corps microbiens s'autolysent et les antigènes spécifiques peuvent diffuser dans le milieu.

Ensuite la turbidité est appréciée au spectrophotomètre de Spekker et une dilution effectuée pour obtenir une même densité optique.

Afin d'éliminer les débris de stromas bactériens, l'émulsion est centrifugée dix minutes à 4 600 t/mn, et le surnageant mis en ampoules qui seront scellées et chauffées une heure à 55°. Bien entendu, un contrôle de stérilité est effectué.

Pour pratiquer nos intradermo-réactions, nous avons injecté 0,1 ml d'antigène dilué au 1/10 en eau physiologique et nos lectures ont été faites à la quarante-huitième heure.

#### RÉSULTATS.

1° *Valeur de nos antigènes.* — Nous étions donc en possession de 5 lots d'antigènes préparés identiquement, mais à partir de chacun des 5 types antigéniques de *C. pseudotuberculosis*.

Tout d'abord nous avons voulu vérifier que les antigènes étaient incapables de déterminer de fausses réactions chez des animaux témoins.

Aussi avons-nous procédé à des intradermo-injections à 90 lapins non infectés.

82 de ces animaux n'eurent aucune réaction, quel qu'ait été le type d'antigène injecté.

5 lapins montrèrent, après quelques heures, un léger érythème au point d'injection, mais il fut toujours peu intense, très fugace et à la quarante-huitième heure il avait disparu.

(1) Nous remercions M. le Dr Girard, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui a mis à notre disposition les différentes souches de *C. Pseudotuberculosis*.

Enfin 3 lapins présentèrent une intradermo-réaction paraissant nettement positive, mais s'il y avait une rougeur manifeste, il manquait l'élément papuleux qui accompagne toujours la réaction allergique.

Nos antigènes ne nous donnaient donc pas de fausses réactions.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons alors eu pour but d'étudier les réactions cutanées d'animaux infectés.

25 lapins furent répartis en 5 groupes. Ceux du premier lot reçurent une injection de 0,5 ml d'une émulsion de bacilles de Vignal et Malassez, vivants et virulents de type I; les animaux du deuxième lot reçurent la même dose de germes du type II, et ainsi de suite, les 5 groupes de 5 lapins recevant les 5 sérotypes de *C. pseudotuberculosis*.

Après une dizaine de jours, nous avons pensé que l'infection s'était suffisamment développée pour créer l'état d'allergie, et nous avons alors pratiqué à nos lapins des intradermo-injections; chaque lot d'animaux recevant l'antigène du type correspondant.

Dès la vingt-quatrième heure, nous avons noté dans tous les cas, au point d'injection, l'existence d'un érythème ayant son maximum d'intensité au deuxième jour. A cette date, outre la macule, nous avons constaté l'existence d'une papule de 1 cm de diamètre environ.

Les jours suivants la réaction s'estompe et disparaît finalement sans laisser de traces.

2° *Date d'apparition de l'allergie.* — Pour situer la durée de la phase ante-allergique, 25 lapins neufs furent utilisés, et comme précédemment répartis en 5 groupes correspondant aux 5 types de *C. pseudotuberculosis*. Infectés par voie sous-cutanée, les animaux subirent des intradermo-injections aux troisième, cinquième et septième jours, avec le type d'antigène correspondant au sérotype qui avait servi à l'inoculation.

Les intradermo-réactions étaient toutes négatives au troisième jour; par contre les 25 animaux réagissaient positivement au cinquième jour.

Nous avons dès lors considéré que l'allergie fait son apparition au cinquième jour chez le lapin infecté expérimentalement.

Dans la littérature, nous n'avons trouvé qu'une référence, celle de Dessy, qui situe au quatrième jour le virage de l'intradermo-réaction.

Ces faits ne sont plus exacts chez des animaux qui reçoivent non plus le germe vivant, mais le germe tué. Chez 10 lapins inoculés dans ces conditions, c'est à la troisième semaine seulement que l'intradermo-réaction est devenue positive.



3° *Absence de spécificité de type.* — Nous avons dit que nous avons préparé 5 antigènes différents, puisqu'il existe 5 types de *C. pseudotuberculosis*. Nous nous sommes alors demandé si l'allergie était spécifique du type ou non.

Les 25 animaux inoculés dans l'expérience précédente furent utilisés et, au quinzième jour de leur infection, les lapins du premier lot infectés par des bacilles de Vignal et Malassez de type I reçurent en injections intradermiques les antigènes des types II, III, IV et V ; tous réagirent nettement et positivement à la quarante-huitième heure.

Nous opérâmes de même avec les autres lots d'animaux. Dans tous les cas nous avons pu constater que l'allergie n'était pas spécifique du type et qu'un antigène préparé avec un type était capable de révéler l'allergie provoquée par l'injection d'un autre sérotype.

Nous retrouvons, à propos de la pseudo-tuberculose, ce qui est bien connu dans la brucellose. La réaction de Burnet à la mélitine est positive, quelle que soit la *Brucella* en cause : *melitensis*, *abortus* ou *suis*.

4° *De la non-existence d'hétéro-allergie vis-à-vis de P. tularensis, P. septica et Brucella.* — Outre le bacille de Vignal et Malassez, la famille des *Parvobacteriaceae* comprend des germes fréquemment rencontrés chez l'homme ou l'animal dans nos régions, à savoir *P. septica*, *P. tularensis* et *Brucella*.

Aussi avons-nous voulu savoir si des animaux infectés par ces différents germes étaient susceptibles de réagir à l'injection dermique de notre antigène pseudo-tuberculeux, et inversement.

Des expériences répétées chez 8 lapins, il ressort qu'en aucun cas nous n'avons pu déceler de réactions d'allergie croisée entre ces quatre espèces bactériennes.

L'allergie dans la pseudo-tuberculose expérimentale du lapin paraît donc bien spécifique.

#### CONCLUSIONS.

Telles sont les recherches que nous avons poursuivies chez l'animal.

Or, dans la littérature médicale, le rôle de *P. pseudotuberculosis*, dans l'étiologie de certaines adénopathies mésentériques, a été souligné à diverses reprises en ces dernières années, et le diagnostic biologique a toujours reposé sur l'isolement du germe ou le sérodiagnostic. *A priori*, un état d'allergie doit exister dans l'infection humaine, comme il se manifeste dans l'infection expérimentale.

D'ailleurs Girard et Mollaret [8], en 1959, ont expérimenté un filtrat de culture dans ce but.

Il est dans notre intention d'utiliser chez l'homme notre antigène, qui nous a donné toute satisfaction dans la pseudo-tuberculose du lapin.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs, suivant la technique de préparation de la tularine, ont utilisé un nouvel antigène pour mettre en évidence l'allergie par intradermo-réaction, dans la pseudo-tuberculose expérimentale du lapin. Cet antigène est spécifique de l'espèce, mais non du type antigénique, et ne donne pas de fausses réactions positives ; l'allergie apparaît dès le cinquième jour. Enfin, il n'y a pas d'allergie croisée entre *P. pseudotuberculosis*, *P. tularensis*, *P. septica* et *Brucella*.

#### SUMMARY

##### SKIN ALLERGY IN EXPERIMENTAL RABBIT PSEUDOTUBERCULOSIS.

The authors applied de Lavergne's technique for preparation of tularin to the preparation of a new antigen allowing to obtain an intracutaneous reaction in rabbit pseudotuberculosis.

This antigen is species specific, and not type specific, and does not yield false positive reactions. The allergy appears on the 5th day.

There is no cross-allergy between *P. pseudotuberculosis*, *P. tularensis*, *P. septica* and *Brucella*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BACHMAN (W.). *Zbl. Bakt., I. Orig.*, 1921-1922, **87**, 171-175.
  - [2] DESSY (G.). *Boll. Ist. sieroter milan.*, 1925, **4**, 133-156.
  - [3] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **411**, 573-574.
  - [4] BOQUET (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **425**, 411.
  - [5] COMMUNAL (R.). *Thèse Méd. Vét.*, Paris, 1945, Foulon, édit.
  - [6] MARACCINI (G.). *Ann. Ig.*, 1953, **4**, 289-293.
  - [7] LAVERGNE (V. DE), HELLUY (J.-R.), BEUREY (J.) et DORNIER (R.). *Bull. Acad. Méd.*, 1950, **134**, 135-136.
  - [8] LATAIX (P.), MOLLARET (H.), COULET (H.) et PERNY (M.). *Mém. Acad. Chir.*, 1959, **85**, 721-727.
-

# VACCINATION D'ANIMAUX DE LABORATOIRE AVEC DES STREPTOCOQUES

## I. - AVEC DES GERMES TUÉS PAR LA CHALEUR.

## II.- AVEC DES GERMES VIRULENTS, VIVANTS, SOUS PROTECTION D'ANTIBIOTIQUES

par F. BOYER (\*).

(*Institut Pasteur. Service de Chimie Thérapeutique B*)

Les essais d'immunisation d'animaux de laboratoire avec des streptocoques sont très nombreux. Les résultats sont assez différents suivant les auteurs et les souches utilisées, mais en général ils sont assez peu satisfaisants. Avec l'avènement des sulfamides et autres antibiotiques les travaux sur ce sujet ont été quelque peu ralentis. Cette question n'a cependant pas été perdue de vue et, dès 1937, M<sup>me</sup> Tréfouël, Nitti et Bovet [1] signalaient que des souris et des lapins, guéris d'une streptococcie expérimentale par des sulfamides, se comportaient comme des animaux neufs lors d'une nouvelle infection avec la même souche de streptocoques et répondaient à nouveau favorablement à un traitement sulfamidé. De son côté, Jawetz, en 1945 [2] trouve que les animaux, guéris d'infections streptococciques expérimentales par la pénicilline, ne présentent aucune immunité à l'égard d'une infection ultérieure.

Par contre, Pattison [3], infectant des souris par deux fois à sept jours d'intervalle avec des streptocoques du groupe B et les guérissant avec de la pénicilline, obtient une immunité chez ces animaux vis-à-vis de la même souche de streptocoques.

Avec d'autres germes, Levaditi, Vaisman et Chaigneau-Erhard [4] confèrent une immunité à des souris par des infections répétées en protégeant ces animaux avec de la tétracycline.

Fari [5] démontre que l'antibiothérapie précoce peut, dans certaines conditions, empêcher la formation d'anticorps chez des souris infectées avec *S. typhimurium* et *D. pneumoniae*.

Dans les expériences que nous rapportons ci-dessous, nous avons tenté d'établir une comparaison entre l'action immunisante de

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1960.

streptocoques tués par chauffage et ces mêmes germes virulents, vivants, inoculés à des animaux protégés avec de la pénicilline ou du paraminophényl-sulfamide.

#### I. — VACCINATION AVEC DES GERMES TUÉS PAR LA CHALEUR.

*Préparation du vaccin.* — Deux souches de streptocoques hémolytiques très virulentes, l'une du groupe A (souche Dignonnet 7) et l'autre du groupe C (souche Griffith), ont été utilisées pour la préparation du vaccin. Ces germes ont été cultivés dans de l'eau peptonée, glucosée à 2 p. 1 000. Chaque souche a étéensemencée séparément dans 100 ml de milieu. Après vingt-quatre heures de séjour à 37°, les germes sont recueillis et lavés, par centrifugation, avec de l'eau physiologique. Après deux lavages, les culots sont à nouveau émulsionnés dans l'eau salée à 8 p. 1 000, mis en tubes qui sont scellés et chauffés, pendant une heure, au bain-marie à 60°. Les émulsions des deux souches contenant environ 40 milliards de germes par millilitre sont alors mélangées.

*Technique d'immunisation.* — Six lots de 40 souris de 15 g environ ont été utilisés dans cette expérience.

Le vaccin a été injecté par voie intrapéritonéale, deux fois par semaine pendant cinq semaines consécutives.

Les souris du premier lot ont reçu 1 million de germes à chaque injection. Celles du deuxième lot 10 millions, du troisième lot 100 millions, du quatrième lot 500 millions, du cinquième lot 1 milliard et celles du sixième lot 2 milliards. Un septième lot de 40 souris a reçu dans les mêmes conditions 0,5 ml d'eau physiologique au lieu de vaccin ; elles serviront de témoins de virulence des souches lors de l'épreuve d'immunisation. Celle-ci a été faite cinq jours après la dernière injection de vaccin, les souris pesaient à ce moment 25 à 30 g.

*Inoculation d'épreuve.* — Chaque lot de souris vaccinées a été divisé en quatre groupes de 10 animaux chacun.

Ces souris ont été inoculées avec les mêmes souches qui ont servi à la préparation du vaccin. Ces souches ont été cultivées dans du bouillon plus un tiers d'ascite pendant dix-huit heures à 37°. Les dilutions de germes sont faites dans du liquide de Tyrode.

Pour chacun des lots et pour chaque souche un lot de souris a reçu 0,5 ml de dilution à  $10^{-5}$ , et l'autre lot 0,5 ml de dilution à  $10^{-2}$ . Ces doses représentent respectivement environ 10 000 et 10 millions de doses mortelles. Un lot de 10 souris non vaccinées (témoins de virulence des souches, ayant reçu uniquement de l'eau physiologique) a été ajouté pour chaque dose et pour chacune des souches.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

L'examen de ce tableau montre qu'il est nécessaire, dans les conditions de nos expériences, d'injecter aux souris au moins 100 millions de germes pour voir apparaître une légère résistance contre 10 000 doses mortelles de streptocoques.

Les résultats sont meilleurs lorsque le nombre de germes

TABLEAU I. — Résistance des souris vaccinées à l'infection.

Vaccination (1)	Infection (2)	Souche Dignonnet 7 - Groupe A										Souris Griffith - Groupe C									
		Souris survivantes chaque jour										Souris survivantes chaque jour									
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
0	$10^4$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoins	$10^7$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$10^6$	$10^4$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	$10^7$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
$10^7$	$10^4$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	$10^7$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
$10^8$	$10^4$	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	4	4	4	4	3	3	3	3	2
	$10^7$	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0	-	-	-	-	-	-	-	-
$5 \times 10^8$	$10^4$	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	8	8	8	8	6
	$10^7$	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	6	5	5	5	5	4	4	4	4	4
$10^9$	$10^4$	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	$10^7$	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	8	5	3	3	2	2	2	2	2	2
$2 \times 10^9$	$10^4$	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	8	8
	$10^7$	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7

(1) Nombre de germes inoculés à chaque injection. (2) Nombre de doses mortelles inoculées.

injectés pour la vaccination est plus élevé, et les souris immunisées avec 2 milliards de germes à chaque injection, soit 1 milliard de chaque groupe sérologique, témoignent d'une résistance marquée, même contre 10 millions de doses mortelles des mêmes souches.

## II. — VACCINATION AVEC DES STREPTOCOQUES VIRULENTS, VIVANTS, INOCULÉS A DES ANIMAUX PROTÉGÉS PAR DES ANTIBIOTIQUES.

Les essais que nous rapportons ci-dessous ont été effectués chez la souris suivant plusieurs procédés.

La souche de streptocoques utilisée (souche Dignonnet 7) a, dans tous les cas, été cultivée en bouillon-ascite à 37°, pendant dix-huit à vingt-quatre heures. Les germes ont été dilués dans du liquide de Tyrode et injectés aux animaux par voie intrapéritonéale.



*Expériences chez la souris.* — Quatre lots de 20 souris de 18 à 20 g ont été infectés avec 0,5 ml d'une dilution à  $10^{-5}$ .

Dès l'infection, les animaux du lot *a* ont été traités par voie intragastrique avec 10 mg de paraminophényl-sulfamide (1162 F). Un deuxième et un troisième traitement ont été administrés vingt-quatre et quarante-huit heures plus tard.

Les souris du lot *b* ont reçu 100 unités de pénicilline par jour en deux injections sous-cutanées. Le traitement a été poursuivi pendant trois jours.

Le lot *c* a été traité dans les mêmes conditions que le lot *b*, mais l'infection et le traitement ont été renouvelés pendant quatre semaines.

Le lot *d* a été traité avec 500 unités de pénicilline en deux injections par jour pendant trois jours.

Le lot *e* a reçu 500 unités de pénicilline par jour, l'infection et le traitement ont été répétés pendant quatre semaines.

Dans une deuxième expérience nous avons inoculé à 40 souris des doses de streptocoques deux cents fois supérieures (1 ml de dilution à  $10^{-3}$ ). En conséquence, nous avons administré à ces animaux 5 000 unités de pénicilline par jour.

Vingt souris (lot *f*) ont été infectées une seule fois et traitées pendant trois jours consécutifs. Chez les 20 autres animaux (lot *g*) l'infection et le traitement ont été répétés pendant quatre semaines.

Dans tous les cas, l'inoculation d'épreuve a été faite dix jours après la dernière infection.

Les souris servant de témoins de virulence de la souche ont reçu 0,5 ml de liquide de Tyrode stérile dans la cavité péritonéale et un traitement antibiotique dans les mêmes conditions que les souris infectées.

*Résultats.* — Nous avons groupé les résultats de ces deux expériences dans le tableau II.

Ce tableau indique que les souris infectées et guéries une seule fois avec le sulfamide ou la pénicilline, quelle que soit la dose de streptocoques inoculée et la dose de médicament administrée, meurent comme des témoins neufs lors d'une nouvelle infection. Ces résultats sont en accord avec ceux signalés par divers auteurs [1, 2]. Une légère résistance semble apparaître chez les souris infectées avec 10 000 doses mortelles de streptocoques et traitées à quatre reprises.

Mais c'est seulement quand l'infection et le traitement ont été faits à fortes doses et à plusieurs reprises que la résistance de ces animaux est très marquée. Les 10 souris infectées avec 10 000 mille doses mortelles ont résisté, ainsi que 3 sur les 10 ayant reçu 1 million de doses mortelles. De plus, ces 13 souris

ont été sacrifiées à la fin de l'expérience, c'est-à-dire douze jours après l'inoculation d'épreuve. Leur sérum sanguin a été injecté par voie sous-cutanée à 10 souris neuves, à raison de 0,25 ml par souris, six heures avant l'inoculation de 10 000 doses mortelles de la même souche de streptocoques. Les 10 souris étaient bien portantes dix jours plus tard, tandis que 10 témoins non traités étaient morts entre la seizième et la vingt-quatrième heure après l'inoculation.

Il nous a été impossible d'obtenir ces résultats en traitant des

TABLEAU II.

Inoculation d'épreuve	Nombre de souris survivantes le jour de l'épreuve	Nombre de souris survivantes chaque jour									
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
0,5 ml à $10^{-5}$ 0,5 ml à $10^{-2}$	Témoins 10 souris	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Témoins 10 souris	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 ml à $10^{-5}$	Lot a) 7 souris	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 ml à $10^{-5}$	Lot b) 16 souris	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 ml à $10^{-5}$	Lot c) 8 souris	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
0,5 ml à $10^{-5}$	Lot d) 19 souris	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 ml à $10^{-5}$	Lot e) 20 souris	9	5	4	0	-	-	-	-	-	-
0,5 ml à $10^{-5}$	Lot f) 20 souris	2	1	1	1	0	-	-	-	-	-
0,5 ml à $10^{-5}$ 0,5 ml à $10^{-2}$	Lot c) 10 souris 10 souris	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		4	3	3	3	3	3	3	3	3	3

souris avec du sulfamide. On ne parvient pas, en effet, à les protéger avec ce produit contre le nombre de germes nécessaire pour faire apparaître l'immunité.

*Expérience chez le rat.* — On sait que le rat, par contre, est facilement protégé par des doses de sulfamide relativement faibles par rapport à son poids, bien que le nombre de streptocoques nécessaire pour le tuer soit très élevé [6].

L'expérience suivante a été réalisée avec 40 rats mâles de 120 g environ, répartis en quatre lots de 10 animaux.

L'infection a été réalisée avec la même souche de streptocoques et suivant le même procédé que pour les souris. Chaque rat a reçu, par voie intrapéritonéale, 1 ml de dilution à  $10^{-3}$ .

Les rats du lot *a* ont été infectés une seule fois et traités pendant trois jours consécutifs avec 20 mg de sulfamide *per os*.

Les animaux du lot *b* ont reçu quatre injections et traitements à sept jours d'intervalle.

Enfin, ceux des lots *c* et *d* ont reçu 1 ml de liquide de Tyrode stérile et un traitement sulfamidé dans les mêmes conditions que ceux des lots *a* et *b*. Ils serviront de témoins lors de l'épreuve d'immunisation, faite le dixième jour après la dernière injection.

Les résultats obtenus sont les suivants, rapportés dans le tableau III.

TABLEAU III.

	Nombre de rats survivants chaque jour									
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	
Témoins lot <i>c</i>	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Témoins lot <i>a</i>	10	9	5	5	5	4	4	4	4	4
Témoins lot <i>d</i>	10	1	0	-	-	-	-	-	-	-
Témoins lot <i>b</i>	10	10	9	8	7	6	6	6	6	6

A la lecture de ce tableau on constate qu'une seule injection, dans les conditions où nous nous sommes placés, confère une certaine résistance aux rats qui y survivent. Cette résistance est renforcée quand les infections sont répétées.

Ajoutons que la recherche du sulfamide dans le sang de ces animaux (1) deux jours avant l'inoculation d'épreuve s'est montrée négative.

### III. — COMPARAISON ENTRE LES DEUX MÉTHODES DE VACCINATION.

L'ensemble des résultats obtenus par ces deux méthodes de vaccination (germes tués par la chaleur et germes vivants sous protection d'antibiotiques) démontre qu'il est possible de vacciner efficacement des animaux avec des streptocoques, à condition d'injecter un nombre de germes important et pendant assez longtemps.

Toutefois, dans le cas des streptocoques vivants, nous avons obtenu de bons résultats quand nous avons inoculé aux souris, une fois par semaine et pendant quatre semaines, 1 ml de dilution à  $10^{-3}$  (soit environ 1 à 2 millions de germes). Pour obtenir les mêmes résultats avec des germes tués par la chaleur il nous a fallu injecter 1 milliard de germes du mélange des deux souches,

(1) Les dosages de sulfamides ont été faits par la méthode de Bratton et Marshall modifiée par Micheline Laurent-Saviard [7].

soit 500 millions de germes de chaque groupe sérologique. Notons aussi que, dans le cas des streptocoques tués, les injections ont été plus rapprochées et plus nombreuses.

L'essai suivant confirme cette différence dans les résultats obtenus avec les deux modes de vaccination.

Une culture de streptocoques de dix-huit heures en bouillon ascite à 37° (souche Dig. 7) a été centrifugée. Le liquide surnageant a été éliminé et remplacé par un même volume d'eau physiologique. Les germes ont été chauffés, dans un tube scellé, au bain-marie à 60° pendant une heure. Cette émulsion, diluée à  $10^{-3}$  dans de l'eau physiologique, a été injectée par voie intrapéritonéale à 20 souris à raison de 1 ml une fois par semaine pendant quatre semaines. Cette expérience a donc été réalisée suivant les mêmes procédés qu'avec les germes vivants. Toutefois, dans ce cas, les souris n'ont pas reçu d'antibiotiques.

L'épreuve d'immunisation a été faite dans les mêmes conditions que dans les expériences précédentes. Dix souris inoculées avec 1 million de doses mortelles sont mortes dans les mêmes délais que des témoins neufs. Parmi les 10 autres infectées avec 10 000 doses mortelles, 3 sont mortes dans les vingt-quatre heures ayant suivi l'inoculation, dans le même temps que les témoins, 2 sont mortes en quarante-huit heures, 2 le troisième jour et les 2 dernières ont succombé le cinquième et le sixième jour. Rappelons que dans les mêmes conditions, avec les germes vivants sous protection antibiotique, nous avons obtenu 100 p. 100 de survivantes au dixième jour.

#### RÉSUMÉ.

Des souris et des rats ont été vaccinés avec des streptocoques hémolytiques des groupes sérologiques A et C.

Cette vaccination a été réalisée suivant deux méthodes :

1° Injections répétées de germes tués par la chaleur ; streptocoques des groupes A et C mélangés ;

2° Injections répétées de streptocoques du groupe A vivants, les animaux étant protégés par de la pénicilline ou du sulfamide.

Les résultats obtenus montrent que pour immuniser les animaux avec des streptocoques il est nécessaire, dans les deux cas, d'injecter un nombre de germes important et pendant un temps suffisant.

Toutefois, à nombre égal, les germes vivants semblent provoquer une immunité supérieure à celle obtenue avec des germes tués par la chaleur.

Le sérum des souris ayant survécu à ces expériences protège des souris neuves contre 5 000 doses mortelles de la même souche de streptocoques.

## SUMMARY

## IMMUNIZATION OF LABORATORY ANIMALS WITH STREPTOCOCCI.

## I. — WITH GERMS KILLED BY HEAT.

II. — WITH LIVING VIRULENT GERMS UNDER PROTECTION  
BY ANTIBIOTICS.

Mice and rats were immunized with A and C hemolytic streptococci.

Two methods were used :

1. Repeated injections of mixed A and C streptococci killed by heat.

2. Repeated injections of living A streptococci, the animals being protected by penicillin or sulfanilamid.

In both cases a large amount of germs should be injected and the duration of the immunization period should be long enough. However living germs seem to induce a better immunity than the same amount of heat-killed germs.

The serum of mice surviving to the experiments protects new mice against 5 000 lethal doses of the same streptococcal strain.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] TRÉFOUËL (J.) et TRÉFOUËL (Th.), NITTI (F.) et BOVET (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, **38**, 30.
  - [2] JAWETZ (E.). *Arch. int. Med.*, 1946, **77**, 1.
  - [3] PATTISON (I. H.). *J. Bact. Path.*, 1949, **61**, 337.
  - [4] LEVADITI (J.-C.), VAISMAN (A.) et CHAIGNEAU-ERHARD (M<sup>me</sup> H.). *Presse méd.*, 1956, **64**, 1579.
  - [5] FARI (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, suppl. au n° 5.
  - [6] BOYER (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 456.
  - [7] LAURENT-SAVIARD *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 98.
-



## CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DES MÉNINGITES A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

par L.-A. ROBIN et H. MAGARD (\*)

(Laboratoire Central du C. H. R. de Rouen)

Au cours de l'automne 1958, du printemps et de l'automne 1959, nous avons eu l'occasion d'isoler six souches de *Listeria monocytogenes*.

Les deux souches de type antigénique I (1) provenaient de sujets adultes ; l'une, isolée du L. C.-R. au cours d'une méningo-encéphalite qui, malgré sa gravité, a évolué favorablement en deux mois ; l'autre, isolée par hémoculture, d'un malade hospitalisé pour coma d'origine indéterminée, mortel en quelques heures.

Les quatre souches de type antigénique IV furent isolées de *méningites néo-natales* survenues, soit chez des prématurés (3 cas mortels en quinze à quarante-huit heures), soit chez un nouveau-né à terme (1 cas mortel en huit jours).

L'étude clinique et épidémiologique de ces cas fera l'objet d'une publication ultérieure.

Nous exposerons tout d'abord l'étude des caractères biologiques de nos souches (bactériologique, pouvoir pathogène expérimental, sensibilité aux antibiotiques et aux sulfamides) en insistant sur le diagnostic différentiel.

Ceci nous permettra d'envisager ensuite les modalités du diagnostic en laboratoire hospitalier, en prenant pour exemple les méningites à *Listeria* ; celles-ci, en raison de leur gravité et de leur évolution souvent foudroyante, se présentent comme des cas d'*extrême urgence* : de la rapidité du diagnostic dépendent les résultats thérapeutiques.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 juillet 1960.

(1) Nous remercions M. le Dr Thibault, de l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu procéder à la détermination des types antigéniques de nos souches et contrôler nos déviations du complément.

## A. — CARACTÈRES BIOLOGIQUES DE NOS SOUCHES.

## I. — CULTURAUX ET ANTIGÉNIQUES.

Les éléments du diagnostic bactériologique de *Listeria monocytogenes* sont bien connus ; ils ont fait l'objet de très nombreuses publications, tant étrangères que françaises, que nous nous excusons de ne pouvoir toutes mentionner ici en raison de leur nombre [1 à 7 et 9 à 14].

Nos six souches répondaient à la description classique : bacilles Gram +, parfois très courts et trapus ; mobiles à + 28° C et pas toujours à + 37° C ; hydrolysant en moins de quatre heures l'esculine ; catalase + ; donnant des colonies brillantes, hémolytiques sur gélose au sang défibriné de cheval ; mannitol négatif ; urée non hydrolysée ; agglutinés par les sérums saturés spécifiques correspondant à leur type antigénique et par un sérum polyvalent O anti-*Listeria*.

## II. — POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

Nous résumons les observations que nous avons pu faire avec nos souches sur divers animaux, par différentes voies d'inoculation.

1° *Conjonctivite suppurée sans généralisation* chez le cobaye ou le lapin, après instillation oculaire de II gouttes d'une culture de *Listeria* pour les six souches.

2° *Rien par voie sous-cutanée* chez le cobaye ou le lapin. Pas de mononucléose sanguine les jours suivants.

3° *Méningo-encéphalite mortelle avec début de généralisation* chez le lapin inoculé par voie intraveineuse avec 0,5 ml d'une dilution au 1/5 d'une culture de *Listeria* de dix-huit heures en bouillon. Mort entre la soixantième et la soixante-seizième heure, après avoir présenté des troubles de l'équilibre.

Les cultures et examens directs à partir des différents organes, du sang du cœur, de la moelle osseuse, sont positifs.

4° *Méningite mortelle et forme nodulaire disséminée* chez la souris après injection intrapéritonéale de 0,1 ml d'une dilution au 1/10 d'une culture de dix heures de *Listeria* en bouillon. Mort en dix-huit à vingt-quatre heures. Congestion méningée intense. Au niveau de la rate et du foie, on retrouve de nombreux petits foyers à centre nécrotique, entourés d'une couronne d'éléments cellulaires mononucléés.

5° *Méningite purulente et lésions de l'encéphale* chez le lapin après injection intracérébrale de 0,05 ml d'une dilution au 1/10 de culture de *Listeria* en bouillon de huit heures. Mort en trente-six à quarante heures, avec abcès nécrotiques et hémorragiques du cerveau, contenant de nombreux polynucléaires altérés.

*Lésions méningées.* — Infiltration à prédominance périvasculaire par de très nombreux éléments inflammatoires mononucléés. Dans les zones où les altérations sont plus discrètes, congestion vasculaire et œdème considérable. On observe les images d'une méningite purulente.

*Lésions cérébrales et cérébelleuses.* — Très nombreux foyers de toutes tailles constitués les uns par de petites hémorragies périvasculaires, les autres par d'énormes zones de nécrose entourées d'un halo d'éléments inflammatoires.

Tous les intermédiaires entre ces deux types de lésions se retrouvent. Autour de ces foyers, phénomènes inflammatoires banaux de la névrogliose. A distance, les cellules ganglionnaires ne sont pas altérées (2).

Cultures positives à partir de ces lésions.

*En résumé.* — Nous avons pu reproduire chez l'animal les stades septicémique, méningo-encéphalitique et le début de la forme nodulaire disséminée. Nos souches étaient à l'isolement trop virulentes pour permettre à l'animal de faire une maladie d'assez longue durée.

### III. — SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES ET AUX SULFAMIDES.

Par la méthode des disques (pouvoir bactériostatique) et sur les milieux spéciaux nous avons étudié la sensibilité de nos 6 souches et de 4 souches de collection vis-à-vis de 14 antibiotiques et de 5 dérivés des sulfamides actuellement utilisés en clinique.

Parmi les antibiotiques la kanamycine, l'érythromycine, la spiramycine paraissent *in vitro* les plus actives de façon constante.

Si la résistance à la bacitracine se révélait à l'étude d'un grand nombre de souches un fait constant, cette propriété pourrait être mise à profit pour l'isolement de *Listeria* d'un produit pathologique polymicrobien.

Pour les sulfamides on peut dire que pratiquement les souches étudiées étaient toutes sensibles, ce qui est conforme aux données classiques.

(2) Etude microscopique effectuée par M. le professeur agrégé Laumonier, de Rouen, que nous remercions vivement.

## B. — DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

Selon la morphologie présentée par *Listeria monocytogenes* dans les produits pathologiques et en culture, le diagnostic différentiel se pose avec les *diphthérimorphes* et *Erysipelothrix rhusiopathiae*, d'une part ; avec les streptocoques plus particulièrement *Streptococcus zymogenes* et les *Streptocoques* du groupe A d'autre part.

*Strep. zymogenes* D est le plus difficile à reconnaître car il présente un grand nombre de caractères communs avec *Listeria* : morphologie en culture souvent identique, grande vitalité, caractères culturels et biochimiques très voisins, structures antigéniques parfois partiellement communes.

*Listeria* pousse un peu moins vite et moins abondamment ; il est un peu moins résistant. Certains caractères classiques cependant permettent à l'observateur prévenu de le reconnaître : catalase positive ; mobilité à + 28° en bouillon glucosé à 0,5 p. 100 ; non-résistance après chauffage à 60° pendant trente minutes : pas d'attaque du mannitol ; positivité du test d'Anton ; agglutination positive avec un sérum spécifique O anti-*Listeria*. De ces signes, seul le premier (*catalase positive*) peut donner une réponse *rapide et sûre* (culture de huit-dix heures), car toutes nos souches de *Listeria* ont présenté ce caractère déjà signalé par Seeliger et Cherry [1].

La mobilité à + 28° s'observe sur une culture de huit-dix heures si l'inoculum a été assez abondant ; mais certaines souches de *Streptococcus zymogenes* D sont mobiles dans les mêmes conditions ; le fait (quoique rare) a été signalé et nous l'avons nous-mêmes observé.

L'attaque du mannitol est habituelle aux streptocoques fécaux ; on peut rencontrer des exceptions ; de plus, il faut attendre le résultat vingt-quatre heures, parfois quarante-huit heures.

Les autres tests donnent des réponses plus tardives et de plus certains *Strept. zymogenes* D ont des antigènes communs avec *Listeria* type I [1, 2, 3, 4].

Sans rappeler les caractères classiques dont la mise en évidence est longue, il nous a paru intéressant de rapporter d'autres caractères permettant une différenciation rapide et sûre entre ces germes pour faire un *diagnostic d'extrême urgence* en laboratoire hospitalier.

Nos essais ont porté sur 12 souches de *Listeria* : 6 isolées récemment dans notre laboratoire et 6 souches de collection. Comparati-

vement, 8 souches de *Streptococcus zymogenes* D isolées dans notre laboratoire ont été étudiées dans les mêmes conditions d'expérimentation.

Toutes les souches étudiées étaient des souches S.

Parmi les très nombreux milieux utilisés au cours de nos expériences, trois méritent, à notre avis, d'être retenus :

#### CULTURE A 45° SUR LE MILIEU SIMPLE DE HAJNA-PERRY.

Nous rappelons la formule de ce milieu :

Peptone pancréatique Vaillant 5 B .....	20	g
Glucose pur anhydre .....	5	g
Phosphate dipotassique .....	4	g
Phosphate monopotassique .....	1,50	g
Azide de sodium .....	0,50	g
ClNa .....	5	g
Eau distillée .....	1 000	ml
Bromocrésol pourpre .....	16	mg
pH = 7,00.		

Stérilisation à 115° pendant trente minutes, après répartition de 2 ml par tube à hémolyse.

Chaque tube estensemencé avec I ou II gouttes d'une culture de neuf-quinze heures en bouillon de *Strept. zymogenes* D ou de *Listeria* et placé à l'étuve à 45° C.

Dès la cinquième heure, la culture de *Strept. zymogenes* D est nettement visible sans virage du milieu au jaune : pour *Listeria* pas de culture visible.

A la septième-neuvième heure, toutes les souches de *Strept. zymogenes* D ont poussé et viré le milieu au jaune ; pas de culture visible, ni de virage pour *Listeria*.

A la vingt-quatrième-quarante-huitième heure, aucune modification des résultats précédents n'est observée.

Nous avons remarqué que *Listeria* pousse à + 45° C sur le même milieu sans azide de sodium.

De même *Listeria* pousse à 45° C sur eau peptonée ordinaire avec une concentration en azide de sodium (solution à 1 p. 100) de 1 ml pour 10 ml de milieu.

Il semble donc que l'azide n'ait un pouvoir inhibiteur sur la culture de *Listeria* qu'en association avec les autres composants du milieu de Hajna-Perry.



## CULTURE A 47° C SUR MILIEU ROCHAIX LIQUIDE.

La formule de ce milieu est la suivante :

Eau distillée .....	1 000 ml
Peptone pepsique UCLAF .....	10 g
Citrate de fer ammoniacal .....	1 g
Esculine .....	1 g
pH = 7,00-7,10.	

Répartir en tubes de 16 mm à raison de 5 ml par tube. Stériliser à 110° pendant trente minutes.

On ensemence chaque tube avec I ou II gouttes d'une culture de neuf-quinze heures en bouillon de *Strept. zymogenes* D ou de *Listeria*. Bain-marie à 46°5-47°.

A la neuvième heure toutes les souches de streptocoques D ont poussé et noirci le milieu ; une souche a poussé mais ne noircit le milieu qu'à la douzième heure.

Aucune souche de *Listeria* n'a poussé ni noirci le milieu.

A la vingt-quatrième et à la quarante-huitième heure, mêmes résultats.

Dans cet essai, on pourrait penser que seule la température joue. Or, toutes les souches de *Listeria* ensemencées dans les mêmes conditions sur une eau peptonée pancréatique poussent au bain-marie à + 47° en neuf heures.

## CULTURE A 37° C SUR MILIEU BILIÉ AU VERT BRILLANT.

Nous préparons le milieu suivant :

Peptone pancréatique Biolyon .....	10 g
Glucose pur anhydre .....	5 g
Bile desséchée Oxoid L. 50 .....	20 g
Eau distillée .....	1 000 ml
pH final = 7,00.	

Après précipitation à 120° pendant trente minutes et refroidissement pendant vingt-quatre heures, filtrer à froid. Répartir en tubes de 16 mm à raison de 7 ml par tube.

Stériliser à 110° pendant trente minutes ; le milieu doit être légèrement opalescent, mais clair par transparence.

Au moment de l'emploi, on ajoute dans chaque tube stérilement 0,5 ml d'une solution de vert brillant à 0,1 p. 1 000.

On ensemence chaque tube avec I ou II gouttes d'une culture en bouillon de neuf-quinze heures d'étuve à 37°.

A la quinzième heure toutes les souches de streptocoques D ont poussé en grumeaux avec dépôt sur les parois du tube et dans le fond où, par agitation, on mobilise un culot plus ou moins visqueux, souvent adhérent. Le milieu n'est plus opalescent.

Les repiquages sont positifs.

Aucune souche de *Listeria* ne pousse dans ces conditions, le milieu reste légèrement opalescent. Les repiquages sont négatifs.

### C. — MODALITÉS DU DIAGNOSTIC RAPIDE EN LABORATOIRE HOSPITALIER

Sur ces données nouvelles et en utilisant certains caractères classiques déjà connus, nous avons étudié expérimentalement une méthode permettant un diagnostic rapide et sûr des méningites bactériennes dont celles à *Listeria*.

#### SIGNES DE PRÉSUMPTION.

1° Présence à l'examen direct de bacilles moyens ou courts (coques ovoïdes), Gram-positifs, intracellulaires; des formes extracellulaires accompagnent souvent ces derniers.

Dans la majorité des cas de listériose, si la ponction lombaire est faite dès l'apparition des premiers symptômes, on ne voit pas de germes à l'examen direct.

2° Suivant les cas, que le prélèvement soit précoce ou non, on notera de la polynucléose ou de la lymphocytose d'emblée (s'il y a polynucléose, celle-ci fera place dès le troisième-cinquième jour, si le malade survit, à de la mononucléose).

Presque toujours les hématies sont nombreuses (hémorragie méningée).

3° L'albumine est toujours très augmentée (œdème cérébral et hémorragie méningée) : 2 à 3 g en général. Le glucose est abaissé dès les premières heures (moins de 0,50 g) et son taux ne cessera de décroître avec l'évolution naturelle de la maladie.

Le taux des chlorures est quasi normal.

4° La numération des éléments figurés à la cellule de Nageotte donne des chiffres qui varient suivant le degré d'évolution de la maladie.

Au début, réaction leucocytaire modérée, parfois inexistante, mais s'intensifiant très rapidement dans les heures qui suivent.

*L'ensemble de ces signes, quand ils existent, doit faire alerter immédiatement le clinicien pour que le traitement sulfamides-antibiotiques soit mis en œuvre sans retard.*

Que l'examen direct ait ou non montré des bacilles Gram-positifs moyens ou courts, on ensemence avec le L. C.-R. conservé à 37° :

a) Une ou deux boîtes de Petri, chaudes, contenant de la gélose à 15 p. 1 000 au sang défibriné de cheval (10 p. 100 du milieu) avec V à X gouttes de L. C.-R. réparties uniformément à la surface du milieu. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37° à plat, couvercle en haut en atmosphère humide. Une des boîtes peut être mise en atmosphère contenant 10 p. 100 de CO<sub>2</sub>.

b) Les tubes de bouillon, de bouillon BO-EG et de Vf + BO-EG avec V à X gouttes de L. C.-R. Etuve à 37° [8].

c) Un tube à hémolyse contenant 2 ml de bouillon glucosé à 0,5 p. 100 avec V gouttes de L. C.-R. Bain-marie à 28° C.

Dans le cas où les premiers signes ne sont pas en faveur d'une listériose, on attendra le résultat des cultures.

#### SIGNES DE FORTE PRÉSUMPTION (neuvième-vingt-quatrième heure).

a) La culture en bouillon à 37° est positive : bacilles plus ou moins courts, Gram-positifs, le plus souvent immobiles, voile très léger en surface qu'on met en évidence en agitant très légèrement la partie supérieure du bouillon ; le voile remonte le long des parois du tube.

b) La culture en bouillon glucosé à 28° peut être positive et montre des bacilles ayant les caractères précédents, mais mobiles.

Si la coloration de Gram révèle une culture pure, à partir de la culture en bouillon à 37° on recherche la catalase, puis on ensemence :

1° Une gélose à l'esculine de Rochaix, largement. Etuve à 37°. Lecture à partir de la deuxième heure jusqu'à la quatrième heure.

2° Un des trois nouveaux milieux différentiels précités, de préférence un Hajna-Perry simple en tubes à hémolyse. Etuve à 45° C. Lecture huitième heure.

3° Un tube de bouillon glucosé à 28° si le b) n'a pas poussé. Lecture dès la sixième-huitième heure.

CARACTERES DIFFERENTIELS	Listeria Monocytogenes	Strepto du groupe A	Strepto D zymogenes	Erysipelothrix rhusiopathiae	Coryné- bactéries
A) rapides (9e - 24e h)					
Recherche de la catalase	+	-	-	-	+
Gélose esculine FOCHAIX					
noircissement en moins de 4 h	+	-	+	-	-
Mobilité à 28°	+	-	(+)	-	-
Culture sur HAJNA-PERRY	-	-	+	-	-
B) précoces 24e h					
Eau peptonée Mannitée					
(parfois 48 h)	-	+	+	-	var. (+)
Hydrolyse de l'urée	-		-		
Hémolyse β gélose sang					
cheval	réduite et par fois tardive	large nette précoce	nette, précoce	réduite et par- fois tardive	+
C) tardifs (48e - 72e h)					
Lait au bleu de SHERMANN	réduit non coagulé	non réduit non coagulé	réduit, coagulé	non réduit non coagulé	
Culture pH 5,5	+	-	+	-	
Culture pH 9	+	-	+	-	
Milieu hypersalé 65 p. 1000	tué	-	+	-	tué
Chaufrage à 60° - 30 min.		tué	résiste	tué	
Sérum O anti Listeria					
spécifique.	agglutination	-	+	-	-
Test de ANTON oeil cobaye	conjonctivite suppurée	-	-	-	
I.V. lapin	Mort 3-4 j. Nodules nécro- tiques dans les organes	rien	rien	Septicémie pas de nodules né- crotiques ni monocucloïose	Pouvoir pathogène variable
	Monocucloïose			sanguine	

4° Un ou deux tubes de gélose en colonies isolées (en vue de l'agglutination et comme contrôle de pureté). Etuve, 37°.

5° Un tube d'eau peptonée mannitée à 1 p. 100. Etuve, 37°.

6° Enfin on pratique le test d'Anton sur l'œil du cobaye.

#### DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL.

1° Si la catalase est positive avec noircissement du milieu de Rochaix en moins de quatre heures, on élimine (au maximum quatre heures après) *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptocoque du groupe A*, *Strept. zymogenes* D.

2° La mobilité à 28° montre qu'il ne s'agit pas de *Corynebactéries*.

Prévenir le médecin traitant si on ne l'a déjà fait.

Ainsi parfois en quinze heures, souvent en vingt-quatre heures, on peut poser le diagnostic bactériologique.

3° La négativité de la culture sur Hajna-Perry à 45° C (sur le Rochaix liquide et sur le milieu bilié au vert brillant) viendra appuyer le diagnostic de *Listeria*.

#### SIGNES DE CONFIRMATION (24° heure et jours suivants)

En dehors de la fermentation du mannitol, apanage habituel des streptocoques fécaux et non de *Listeria*, les caractères résumés dans le tableau I confirmeront le diagnostic.

#### CONCLUSION

De l'étude de six souches de *Listeria monocytogenes*, isolées chez des adultes (2), chez des prématurés ou des nouveau-nés (4), il résulte que les caractères biologiques (culture, pouvoir pathogène pour l'animal ainsi que la sensibilité aux antibiotiques et aux streptocoques. C'est *Streptococcus zymogenes* D qui présente le *Erysipelothrix rhusiopathiae*, les diptérimorphes et les différents streptocoques. C'est *Streptococcus zymogenes* D qui présente le plus grand nombre de caractères communs avec *L. monocytogenes*. Les auteurs décrivent un certain nombre de caractères nouveaux qu'ils ont pu mettre en évidence et qui, conjointement avec les données classiques, permettent le diagnostic différentiel avec ce germe. Ils recommandent en particulier trois techniques : la culture à 45° sur le milieu simple de Hajna-Perry, la culture à 47° sur milieu de Rochaix liquide et enfin la culture à 37° sur milieu bilié au vert brillant.



## SUMMARY

THE BACTERIAL DIAGNOSTIC OF *Listeria monocytogenes*  
MENINGITIDIS.

Study of six strains of *L. monocytogenes* isolated from adults (two strains), premature or new-born infants (four strains). The biological properties (culture, pathogenicity for laboratory animals, sensitivity to antibiotics and sulfanilamides) allow the differential diagnostic between *Listeria* and *Erysipelothrix rhusiopathiae*, diphterimorph bacilli and certain streptococci. Among all these germs, *Streptococcus zymogenes* D possesses the greatest number of common properties with *L. monocytogenes*. Certain new characters are demonstrated, which can be used, in addition to classical data, to allow a rapid differential diagnostic with this *Streptococcus*.

The authors recommend three techniques : culture at 45° C on simple Hajna-Perry's medium ; culture at 47° C in liquid Rochaix' medium, and culture at 37° C on brilliant green + bile medium.

## BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

- [1] SEELIGER (H.) et CHERRY (W. B.). *Human listeriosis*. U. S. Depart. Health, Educ. and Welfare, Publ. Health Serv., Atlanta, Georgia, 1957.
- [2] PATTERSON (J. S.). *J. Path. Bact.*, 1940, **51**, 427.
- [3] SEELIGER (H.) et LINZENMEIER (G.). *Z. Hyg.*, 1953, **136**, 335.
- [4] SEELIGER (H.). *Monographie complète sur le sujet*, Barth, édit., Leipzig, 1958.
- [5] COULOMBIER (G.). *Thèse*, Paris, 1955 ; *Arch. fr. Pédiatr.*, 1956, **13**, 943.
- [6] DUMAS (J.). *Bact. méd.*, 1959, 565 b.
- [7] ENJALBERT (L.), BARDIER (A.) et COMBES (B.). *Presse méd.*, 1957, **65**, 1667.
- [8] ROBIN (L.-A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 234.
- [9] GAGNON (J.) et MARTINEAU (B.). *Ann. Anat. Path.*, 1959, **4**, 91.
- [10] HAGEMANN (U.), SIMON (H.) et BIENENGRAEBER (A.). *Zbl. allg. Path.*, 1953, **90**, 17.
- [11] SIMON (H.). *Zbl. allg. Path.*, 1953, **90**, 353.
- [12] BENAZET (F.), BONJEAN (M.), COLOBERT (L.) et SOHIER (R.). *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp.*, 1957, **73**, n<sup>os</sup> 1 et 2.
- [13] GAUTIER (P.). *Rev. Pratic.*, 1958, **8**, 3481.
- [14] F. BONNENFANT. *Maladies infectieuses*, Flammarion édit, Paris.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 6 octobre 1960.

Présidence de M. Robert FASQUELLE.

---

## NÉCROLOGIE

### ARMAND NÉVOT

(1891-1960)

En forêt de Brocéliande, à Paimpont, en plein centre de la Bretagne, Armand Névoz est né le 15 décembre 1891. Orphelin de père à quatre ans, c'est son beau-père, M. Nicolas et son oncle le Dr Louis Névoz, le réputé praticien d'Avranches, qui décidèrent que l'instruction était le plus beau cadeau qu'ils pussent lui faire. Pensionnaire au Collège de Dinan, l'enfant d'emblée affirme sa volonté et son goût de l'enseignement ; il travaille avec ardeur et emporte la plus belle récompense, le prix de la ville de Dinan. Agriculture ou Médecine ? On devine la conversation des deux protecteurs. Un compromis est adopté : Armand Névoz fait ses études vétérinaires, à l'Ecole de Toulouse ; il sort en tête de sa promotion en 1913. Le voici vétérinaire militaire : le service, la guerre 1914-1918, puis il part en Afrique, où il organise, comme chef du Service zootechnique de Haute-Guinée, la lutte contre la peste bovine et la péripneumonie contagieuse. Il est nommé vétérinaire capitaine et participe à l'occupation de la Rhénanie de 1920 à 1924.

Il quitte alors l'armée et entre dans les Services Vétérinaires de la ville de Paris et du département de la Seine, chef du Laboratoire du Lait d'abord, puis du Laboratoire d'Hygiène Alimentaire. Son patron, M. Martel, apprécie ses qualités, sa volonté d'apprendre toujours plus et l'autorise à prendre ses premières inscriptions à la Faculté de Médecine. Névoz lui annonce bientôt son succès à l'Externat ; il travaille alors véritablement à « temps plein » : le matin, il est externe, élève de Chauffard, Fernand Besançon, Rathery, Baudoin, qui lui permettent d'exercer ses fonctions à l'hôpital de très bonne heure ; puis, avec ponctualité, il remplit son service au Laboratoire vétérinaire ; le soir, il suit des conférences d'Internat, et ses camarades de conférence se rappellent avec émotion ce curieux compagnon, beaucoup plus âgé qu'eux, d'une ardeur et d'une assiduité remarquables, mais qui n'a pas l'intention de se présenter au concours ; Névoz avait trouvé le moyen, aux heures qui lui convenaient, de bénéficier d'un remarquable enseignement dirigé de la médecine.

Il passe sa thèse de docteur en médecine en 1930, sa thèse de doctorat vétérinaire en 1937. La première est consacrée au contrôle des laits, la seconde à l'inspection des viandes. Elle marquent l'orientation qui va être celle de ses principaux travaux sur l'introduction des techniques microbiologiques en hygiène alimentaire. Il étudie les empoisonnements d'origine bactérienne, le botulisme, les toxi-infections à salmonelles, les intoxications staphylococciques et précise les conditions de recherche dans les aliments des bacilles tuberculeux, des bacilles typhiques et paratyphiques des streptocoques, des staphylocoques. Son livre, paru en 1947, sur le contrôle bactériologique pratique des denrées alimentaires, résume le fruit de ses 25 ans d'études sur le sujet. La qualité maîtresse de Névot y apparaît : voir simple et pratique. Elle lui vaut d'être chargé de représenter la France à l'O. M. S., au Comité des Denrées Alimentaires du Pacte de Bruxelles, de siéger aux Conseils Supérieurs d'Hygiène de France et de la Seine, d'être le conseiller technique d'hygiène alimentaire de l'Assistance Publique, qu'il était en train de doter de l'organisation la plus rationnelle pour le ravitaillement en viandes.

Voir simple et pratique : c'est cette même qualité qui lui avait permis, sous l'occupation, dans la charge difficile du contrôle de la viande destinée à la nourriture des Parisiens, de se maintenir à distance de deux dangers : une trop grande tolérance, qui eût risqué de laisser survenir de nombreuses intoxications alimentaires, une trop grande sévérité, qui eût accentué la famine. Dans l'une ou l'autre éventualité, c'est lui qui aurait été considéré comme le responsable. En silence, les deux écueils furent évités : tous les Parisiens lui en doivent reconnaissance.

Simple et pratique : tel était aussi l'enseignement d'Armand Névot, telle était la raison de son succès. En effet, depuis trente ans, au Laboratoire de Bactériologie de la Faculté, sous la direction successive de MM. Lemierre, Debré et Gastinel, avant qu'il ne devienne comme Professeur sans chaire mon collègue direct, il participait à la fois à l'enseignement des jeunes élèves de 3<sup>e</sup> année comme à celui des futurs médecins biologistes inscrits au cours complémentaire. Aux premiers était destiné le manuel de *Travaux pratiques de bactériologie* qu'il avait mis au point avec Henri Bonnet et qui eut tant d'éditions successives ; les seconds, à travers la France, qu'ils exercent en ville ou à l'hôpital, ont tous aujourd'hui, sur la paillasse de leurs laboratoires, ouvert et plein de taches tant il sert quotidiennement, son livre *Le diagnostic bactériologique en pratique médicale*, dont il corrigeait, la veille du tragique accident d'automobile les épreuves de la seconde édition.

Chaque jour à la Faculté, à la porte du laboratoire d'Armand Névot, se pressait une foule d'anciens élèves, d'amis vétérinaires et médecins, de laborantines, qui venaient lui demander conseil. Névot en effet, était d'un abord aimable, accueillant, toujours prêt à la discussion ; il écoutait avec intérêt, avec aménité l'exposé des opinions contraires aux siennes, mais il faisait toujours montre d'une grande ardeur à les réfuter, riche de multiples arguments, car il n'exprimait jamais une idée sans avoir beaucoup réfléchi et expérimenté ; sa plume était

acerbe, volontairement, et tout effort pour essayer de l'amener à l'adoucir s'avérait complètement vain. C'est ainsi que nous aimions « Monsieur Névoz ». La disparition il y a deux ans de son épouse, femme d'une exquise distinction intellectuelle et d'une exceptionnelle érudition, l'avait beaucoup affecté ; son cœur s'était reporté sur son fils et sa belle-fille, les docteurs Pierre et Monique Névoz et leur fils, le petit Armand Névoz.

Je n'ai jamais rien vu d'aussi émouvant que la matinée du jeudi 15 septembre dernier : de la modeste maison « Les Capucines », blottie au coin du bois et où avaient afflué les messages de sympathie de ses collègues de l'Académie de Médecine et de l'Académie Vétérinaire, le cortège se met en marche, passe le long de l'étang et s'engage sous « le Porche » : en tête les drapeaux tricolores des Anciens Combattants et des sociétés locales, puis, portées par les jeunes, les immenses couronnes offertes par la Faculté de Médecine de Paris, les Services Vétérinaires de la Seine, l'Ecole d'Odontologie, les sociétés savantes ; derrière le corbillard, tiré par le vieux cheval, tous les habitants de la commune, précédés de leur maire et de M. Allaire. On fait halte à l'ancienne chapelle abbatiale où la messe funéraire est célébrée devant les reliques de St-Judicael. Puis, sous une pluie battante, Armand Névoz est conduit par ses amis à sa dernière demeure, qu'il a choisie au lieu de sa naissance, en plein centre de la Bretagne, à Paimpont, en forêt de Brocéliande...

R. F.

## PRÉSENTATION D'OUVRAGE

**M. Lépine** : J'ai l'honneur de présenter à la Société Française de Microbiologie un exemplaire du rapport *OEil et Virus* (1), rédigé pour la Société Française d'Ophtalmologie à l'occasion du Congrès qu'elle a tenu au mois de mai 1960, et qui paraît aujourd'hui en librairie en un volume de 1 022 pages avec de nombreuses illustrations et 20 planches hors-texte dont 17 en couleurs.

Il est dans la tradition de la Société Française d'Ophtalmologie de confier à un ou plusieurs rapporteurs la rédaction de rapports étendus destinés à faire le point d'une question et à servir de source de documentation ou de base de référence pour les travaux cliniques et les recherches touchant au sujet traité. Lorsqu'il y a quatre ans, l'ensemble des viroses oculaires a été mis à l'ordre du jour pour le Congrès de 1960, il était évident qu'un sujet de cette taille ne pourrait être abordé que par une équipe réunissant virologistes et ophtalmologistes.

(1) R. Nataf, P. Lépine, G. Bonamour : *OEil et Virus*, Masson, édit., Paris, 1960. Prix : 140 NF.

J'ai eu la charge de rédiger la partie virologique générale, qui occupe 140 pages, et y ai tenté de faire la synthèse de nos connaissances sur la nature des virus, de même que sur leur rôle dans les infections oculaires ou à propos de celles-ci. Il ne s'agit pas là, bien entendu, d'un traité de virologie, mais d'une étude destinée à donner à des médecins non spécialistes, comme peuvent l'être les cliniciens, un aperçu de nos conceptions actuelles, des principales techniques et de l'évolution des idées sur un sujet où depuis une dizaine d'années les progrès accomplis ont été particulièrement spectaculaires.

Le reste de l'ouvrage, qui est plus strictement ophtalmologique et essentiellement clinique, a été rédigé par R. Nataf et G. Bonamour. Il traite des viroses oculaires en abordant successivement les différentes structures anatomiques de l'organe : paupière, conjonctive, cornée, sclérotique, appareil lacrymal, uvée, nerf optique, muscles moteurs, rétine et œil embryonnaire. C'est dire qu'on y trouvera outre l'important chapitre du trachome, toutes les maladies à virus qui sont responsables des conjonctivites, kératites, uvéites et autres manifestations oculaires.

Une troisième partie traite des manifestations ophtalmologiques au cours des maladies générales à virus, aspect qui pourrait paraître accessoire si l'on ne savait avec quelle fréquence l'œil réagit au cours des différentes maladies à virus et plus particulièrement au cours des viroses neurotropes ; c'est dire que, pratiquement, toutes les maladies à virus de l'homme sont passées en revue à propos des troubles ophtalmologiques, aigus ou chroniques, qu'elles sont susceptibles de déclencher.

Enfin, une quatrième partie expose les syndromes actuellement admis comme étant de nature virale, mais dont la preuve expérimentale ou sérologique manque encore. Elle réunit les ectodermoses pluri-orificielles comme la maladie de Reiter, le pemphigus, l'éruption varicelliforme de Kaposi, l'aphtose, etc. Un chapitre traite de la maladie de Behçet et un autre des syndromes uvéo-méningés.

Cette rapide énumération montre quelle somme d'informations est rassemblée dans ce volume pesant, où chaque chapitre a été, selon la tradition de la Société d'Ophtalmologie, complété par une abondante bibliographie de références.

Les auteurs ont apporté tous leurs soins à l'illustration particulièrement abondante, et l'éditeur a fait en sorte que la présentation du volume soit à la hauteur de l'importance des sujets traités.

Il est regrettable qu'une date de parution inexorable en ce qu'elle était liée à un Congrès, n'ait pas permis une révision plus soignée de certains chapitres où persistent un certain nombre d'erreurs matérielles dans l'orthographe des noms propres. L'ensemble n'en fait pas moins honneur à la Société Française d'Ophtalmologie qui a pris l'initiative de cette publication.



## COMMUNICATIONS

### MISE EN ÉVIDENCE, PAR LES TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE, D'ANTICORPS AU COURS DE L'INFECTION SYPHILITIQUE

par J. THIVOLET, D. GROSPIRON et M. MURAT.

(Laboratoire d'Hygiène [Professeur R. SOHIER]  
de la Faculté de Médecine de Lyon)

Les techniques d'immunofluorescence introduites par A. H. Coons ont déjà donné lieu à de nombreuses applications. Elles ont été utilisées récemment par Deacon d'une part, par Borel et Durel d'autre part pour le dépistage des anticorps apparaissant au cours de l'infection syphilitique. C'est en nous guidant sur les données apportées par Borel que nous avons entrepris cette étude des conditions de mise en évidence des anticorps au cours de l'infection syphilitique dont nous apportons les résultats préliminaires.

#### TECHNIQUES.

I. PRINCIPES. — La mise en évidence des anticorps peut se faire selon deux principes valables quel que soit l'antigène.

*Technique A.* — On fait agir successivement sur les tréponèmes fixés le sérum à éprouver, puis un sérum animal anti-globuline humaine fluorescent. Lorsque le sérum contient des anticorps, ils se fixent sur les tréponèmes et sont révélés par le sérum fluorescent anti-globuline qui rend les tréponèmes fluorescents. Avec cette technique, les sérums positifs provoqueront la fluorescence. C'est la technique utilisée avec succès par Deacon et par Borel.

*Technique B.* — On peut également utiliser le blocage réalisé par un sérum riche en anticorps qui saturent les liaisons antigéniques du tréponème.

On fait donc agir successivement sur les tréponèmes le sérum à éprouver, puis un sérum humain syphilitique fluorescent. De cette manière, les tréponèmes ne sont rendus fluorescents que si le sérum dont ils ont subi au préalable le contact ne contenait pas d'anticorps susceptibles de bloquer leurs liaisons antigéniques. Nous avons tenté d'appliquer cette technique.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Nous avons repris les données classiques en ce domaine.

a) *L'antigène* : il s'agit de suspension de tréponèmes pathogènes, déposés sur lame et fixés par la chaleur.

b) *Les sérums fluorescents* : qu'il s'agisse de sérums anti-globuline humaine ou de sérums syphilitiques humains, le « marquage » par fluorochrome a été exécuté selon les techniques classiques en utilisant l'isothiocyanate de fluorescéine.

c) *L'installation optique* : elle comporte essentiellement un brûleur HBO 200 Osram, un filtre d'excitation BG 12 et un filtre oculaire Euphos Leitz. Un microscope monoculaire à fond noir de modèle courant a été utilisé.

### CONDITIONS D'APPLICATION PRATIQUE

Elles ont été étudiées pour les deux techniques découlant des principes énoncés ci-dessus, mais surtout pour la technique A, la technique B n'ayant reçu qu'un commencement d'application.

I. TECHNIQUE A. — Nous avons utilisé d'abord sans aucune modification, la technique indiquée par Borel et Durel, qui ne nous a pas permis de retrouver exactement les résultats de ces auteurs dans ces conditions. Nous avons constaté en effet trois différences principales :

a) Fluorescence non spécifique, habituellement de faible intensité obtenue avec certains sérums négatifs, même dilués au 1/10 comme le recommandent ces auteurs ;

b) Fluorescence spécifique d'intensité très inférieure à celle obtenue par Borel et Durel ;

c) Reproductibilité irrégulière surtout dans le degré de la fluorescence.

L'étude de différents éléments de la technique nous a apporté les résultats suivants, comportant éventuellement des incidences pratiques.

L'antigène peut être fixé indifféremment par la chaleur ou l'acétone. Le traitement des lames par l'hyaluronidase améliore la qualité de la fluorescence obtenue, tandis que l'action de la trypsine est peu nette et celle du versène, péjorative.

Les sérums à éprouver ne peuvent être utilisés purs, au risque de provoquer des fluorescences non spécifiques qui sont supprimées soit par dilution jusqu'au 1/30, soit par chauffage.

Le conjugué fluorescent anti-globulines doit être élaboré à partir d'un sérum possédant le titre le plus élevé possible contre les globulines humaines. Le titre « anti-globuline » du sérum anti-homme, apprécié par le « ring-test » à anticorps constant, doit atteindre et dépasser  $10^{-5}$  si l'on veut obtenir une fluorescence intense (1). La conservation des conjugués n'est bonne que s'ils sont stockés sans avoir subi une absorption sur poudres d'organes.

Le temps de contact du sérum puis du conjugué est fixé habituellement à trente minutes. Nous avons constaté que *l'augmentation des temps de contact, soit du sérum soit du conjugué, est susceptible*

(1) Le caractère très approximatif de cette technique ne permet guère son utilisation qu'à titre comparatif

*d'améliorer grandement l'intensité de la fluorescence obtenue pour le même sérum ou le même conjugué.* Aucune fluorescence parasite non spécifique n'est entraînée par cet allongement des temps de contact au moins jusqu'à des temps de trois heures pour chaque élément. On peut ainsi obtenir avec un conjugué même assez faible des fluorescences brillantes.

II. TECHNIQUE B. — Nous n'avons pas encore étudié en détail les conditions d'application pratique de cette technique, dont nous avons indiqué ci-dessus le principe. Nous avons utilisé un sérum d'un sujet humain atteint de syphilis, ayant un titre égal à 1/100 en anticorps immobilisants, apprécié par la réaction quantitative de Nelson et Mayer. Ce sérum a été conjugué avec l'isothiocyanate de fluorescéine dans les mêmes conditions que les sérums « anti-globuline humaine ». Ce sérum provoque une fluorescence des tréponèmes médiocre après un temps de contact d'une heure, bonne après deux heures, excellente après trois heures.

Si l'on fait agir, au préalable, un sérum positif sur l'étalement de tréponèmes, la fluorescence n'apparaît plus après addition du sérum fluorescent. Par contre, après action d'un sérum négatif, l'addition du sérum fluorescent provoque encore la fluorescence des tréponèmes.

#### RÉSULTATS.

Nous les exposerons rapidement, car nous ne les considérons pas comme définitifs. La technique utilisée nous paraît en effet susceptible d'être améliorée en fonction des diverses données que nous venons d'indiquer et des travaux qui sont actuellement poursuivis.

Les résultats rapportés dans le tableau I ont été obtenus avec la technique suivante :

##### Technique A.

Conjugué préparé à partir d'un sérum « anti-globuline humaine » titrant  $10^{-5}$  au « ring-test ».

Sérums inactivés à 56° pendant trente minutes, utilisés dilués à 1/30.

Temps de contact de trente minutes pour les sérums à tester et de une heure pour le conjugué fluorescent.

Cette première série de résultats met en évidence :

1° La spécificité de la réaction de fluorescence, qui n'est peut-être pas aussi nette que le fait apparaître cette statistique, car, depuis, il nous est apparu que certains sérums peuvent exceptionnellement provoquer une fluorescence non spécifique de faible intensité dans des conditions qui sont encore à l'étude.

2° La sensibilité très grande chez les sujets atteints de syphilis et traités.

Nous n'avons effectué qu'un petit nombre de réactions quantitatives. Les titres obtenus par la technique de fluorescence paraissent plus élevés que ceux obtenus pour les mêmes sérums avec le test d'immobilisation des tréponèmes de Nelson-Mayer.

Ces résultats concordent assez étroitement avec ceux qui ont été

TABLEAU I. — Résultats obtenus comparativement sur 143 sérums.

Diagnostic	T.P.I.			Fluorescence		Sérologie classique	T.P.C.F. *
	+	±	+	+	-		
Non syphilitiques	0	0	40	0	40	3 + / 35	2 + / 26
Syphilitiques (traités et non traités)	73	1	29	88	15	42 + / 96	27 + / 51
Non traités	16	0	0	16	0		
Traités	57	1	29	72	15		

(\*) T. P. C. F. : Réactions de déviation du complément utilisant les antigènes tréponémiques.

rapportés par Borel et Durel d'une part, Censuales et Garofalo d'autre part. La spécificité de la réaction paraît excellente et certainement meilleure que celle de la sérologie utilisant les antigènes cardiolipidiques et tréponémiques. La sensibilité jugée surtout en fonction des résultats obtenus au cours de syphilis traitées paraît supérieure à celle du test de Nelson. Ceci est apparent dans notre statistique (88 réponses positives avec le test fluorescent, contre 73 positives avec le test de Nelson) et dans celle de Borel (106 contre 90). Nous n'avons pas eu l'occasion d'éprouver des sérums recueillis au cours de la syphilis primaire ; mais dans 7 cas de syphilis primaire non traitée, Borel et Durel ont obtenu une réponse positive par le test de fluorescence alors que le test de Nelson était encore négatif.

Les sérums de sujets atteints de syphilis que nous avons soumis comparativement aux tests de Nelson, d'immunofluorescence de la sérologie classique et des réactions utilisant les antigènes tréponémiques ont fourni un pourcentage de positivité beaucoup plus élevé avec le test d'immunofluorescence qu'avec la sérologie classique et le T. P. C. F.-test. Censuales et Garofalo qui ont également comparé les quatre types de réaction ont noté qu'elles concordaient sur 100 sérums, trente-huit fois dans la positivité, alors que seuls le test de Nelson et le test d'immunofluorescence étaient négatifs dans les 16 autres cas.

Ces résultats sont donc encourageants mais ne peuvent encore être considérés comme définitifs.

CONCLUSION. — L'utilisation de l'immunofluorescence pour le diagnostic sérologique de la syphilis paraît, à la lumière de cette étude préliminaire, très riche de promesses. Les premiers résultats que nous avons obtenus confirment ceux rapportés déjà par Borel et Durel, mais il paraît prématuré de proposer une technique utilisable pratiquement. L'influence de nombreux facteurs reste encore à préciser avant d'en arriver au stade de l'exploitation clinique.

## SUMMARY

DEMONSTRATION, BY MEANS OF IMMUNOFLUORESCENCE, OF ANTIBODIES  
IN THE COURSE OF SYPHILITIC INFECTION.

The experiments show that the use of immunofluorescence for the serological diagnostic of syphilis may yield very good results. The preliminary findings obtained by the authors confirm those previously described by Borel and Durel. But it seems still impossible to propose a practical technique. The influence of many factors must be determined before any method could be adopted in clinical routine.

## BIBLIOGRAPHIE

- BOREL (L.-J.) et DUREL (P.). *Path. Biol.*, 1959, **7**, 2517-2525.  
 DEAGON (W. E.), FALCONE (V. H.) et HARRIS (A. D.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1957, **96**, 477-480.  
 CENSUALES (S.) et GAROFALO (V.). *Rev. sierol. sierot. ital.*, 1959, **34**, 161-167.  
 COONS (A. H.) et KAPLAN (M. H.). *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 1-38.  
 PROOM (H.). *J. Path. Bact.*, 1943, **55**, 419-426.  
 SIDNEY LANSKY (M. D.) GLENNE, Mc KORMICK Jr (M. D.) et DURHAM (N. C.). *Arch. Dermatol.*, 1960, **81**, 59-65.

## ARGAS PERSICUS VÉHICULE ÉVENTUEL DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VAR. HOMINIS.

par J. KERREST

(Institut Pasteur de Dakar)

Appartenant à l'ordre des Acariens, à la famille des Ixodidés, à la sous-famille des Argasinés, *Argas persicus* Oken 1818 est une espèce cosmopolite, très commune, qui vit de préférence dans les basses-cours. Les larves hexapodes ne vivent que sur les oiseaux, mais les jeunes nymphes et les adultes s'attaquent à l'homme.

Le rôle de cet Acarien dans la transmission de certaines borrélioses humaines est probable. Par ailleurs on a signalé qu'*Argas persicus* avait pu véhiculer *Pasteurella pestis* pendant cent dix jours et qu'il avait été à l'origine d'un cas de charbon bactérien humain (cité par E. Brumpt).

Nous nous bornons ici à rapporter un fait sans vouloir conclure par la généralisation.

Un lot d'*Argas persicus* recueilli sur des volailles à Kiffa, Mauritanie, fut broyé dans un mortier stérile et inoculé par voie sous-



cutanée à un cobaye. Cet essai entraînait dans le cadre d'une recherche systématique de souches rickettsiennes chez diverses espèces d'Acariens de l'Ouest africain.

L'animal inoculé ne présenta au cours de trois semaines d'observation aucun symptôme permettant d'évoquer une rickettsiose. Passé ce délai, il fut conservé en isolement. Le quatre-vingt-quatrième jour de cet isolement, il mourait et l'autopsie mettait en évidence des lésions typiques de tuberculose généralisée expérimentale : énorme masse ganglionnaire caséifiée au niveau de la région inguinale droite, correspondant au point d'inoculation du broyat, ganglions iliaques et aortiques caséifiés, rate très hypertrophiée et truffée de follicules, quelques follicules sur le foie et le poumon.

L'examen bactériologique des broyats de la masse ganglionnaire inguinale et de la rate a mis en évidence de nombreux bacilles alcool-acido-résistants dont la morphologie était caractéristique de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'examen anatomo-pathologique de la rate démontrait le caractère tuberculeux des lésions.

Après homogénéisation, le broyat de ganglion fut ensemencé en milieu de Jensen modifié (Coletso et coll.).

Dans les délais normaux est apparue une culture eugonique de bacilles tuberculeux humains typiques.

Tels sont les faits et ils méritent d'être étudiés. Toutes garanties existent quant à la stérilisation du matériel utilisé pour l'inoculation. Il pourrait certes s'agir d'une tuberculose spontanée du cobaye, mais le point de départ de l'infection localisé du seul côté où fut pratiquée l'injection paraît exclure cette possibilité.

Il semble donc bien que le broyat d'*Argas persicus* contenait des bacilles tuberculeux vivants et virulents.

Quelle est la signification de ce fait ? Dans la région de Kiffa, Mauritanie, et dans l'agglomération en particulier, il existe un grand nombre de malades atteints de tuberculose à un stade avancé et l'hygiène de ces malades laisse encore beaucoup à désirer. Les animaux domestiques vivent en contact permanent avec les habitants. Les *Argas*, parasites des volailles et sédentaires par excellence, peuvent donc se trouver en contact sur le sol avec des produits bacillifères et s'infecter accidentellement. D'autre part, la bactériémie tuberculeuse existe certes, et l'infection de l'*Argas*, adulte ou nymphe, au cours d'un repas de sang sur l'homme, est une possibilité qu'il reste naturellement à démontrer.

Les faits mentionnés ici, n'ont probablement qu'une importance limitée, mais il nous a paru cependant intéressant de les rapporter ; l'attention ne semblait pas avoir été jusqu'à présent attirée sur le rôle éventuel de cet acarien dans l'épidémiologie de la tuberculose.

## PRODUCTION DE COLICINES CHEZ LES *SALMONELLA*. (Étude sur 410 souches)

par P. VASSILIADIS, J. PAPA VASSILIOU, A. GLAUDOT  
et P. SARTIAUX.

(Institut de Médecine Tropicale « Princesse-Astrid » à Léopoldville  
[Directeur : Dr G. COURTOIS]  
et Laboratoire de Microbiologie de l'Université d'Athènes, Grèce  
[Directeur : Professeur C. MOUTOUSSIS])

On ne connaissait jusqu'à présent que 8 souches de *Salmonella* colicinogènes [1, 2, 3, 4] appartenant toutes au groupe B. Sept d'entre elles sont des *S. typhimurium*, l'autre une *S. paratyphi* B. Toutes produisent la colicine I à l'exception d'une souche de *S. typhimurium* qui produit la colicine K [4]. Les recherches antérieures avaient été limitées environ à 272 souches appartenant à 4 groupes O (A, B, C<sub>1</sub> et D<sub>1</sub>) et à 8 sérotypes. De plus 225 de ces souches appartenaient au groupe B, dont 91 étaient des *S. typhimurium* et environ 132 des *S. paratyphi* B.

Le présent travail porte sur une gamme de groupes O et de sérotypes beaucoup plus considérable. Ce matériel nous a permis de constater que la colicinogénèse chez les *Salmonella* n'est pas aussi rare qu'on le pensait, ni surtout limitée au seul groupe B. Au contraire nous l'avons retrouvée dans plusieurs autres groupes O et sérotypes.

**MATÉRIEL.** — Nous avons examiné 90 souches de *S. typhi* et 320 souches d'autres *Salmonella* appartenant à 97 sérotypes et 27 groupes O différents (tableau I).

La plupart des *S. typhi* ont été isolées par hémoculture, quelques-unes par coproculture.

L'origine des autres *Salmonella* examinées est la suivante :

*Hommes* : coproculture, 112 souches ; hémoculture, 9 souches ; pus d'ostéite chez des sicklanémiques, 6 souches ; arthrite du genou, 1 souche. Au total, 128 souches.

*Organes d'animaux* : 142 souches.

Toutes ces souches proviennent du Congo Belge et du Ruanda-Urundi.

Parmi les *Salmonella* reçues d'autres pays nous avons examiné :

a) *Souches de collections* : 24 (proviennent de l'Institut Pasteur de Paris, du Statens Serum Institut de Copenhague et du Central Public Health Laboratory de Londres).

b) *Farines de poissons* : 26 souches.

**TECHNIQUES.** — 1° *Colicinogénèse* : les souches ont été examinées par la méthode de la double couche de Gratia modifiée par Fredericq [5].

2° *Typage des colicines* : ce typage a été fait à l'aide de 20 mutants résistants à différentes colicines et sensibles à d'autres.

## RÉSULTATS.

Nos résultats figurent aux tableaux I et II. De l'examen du tableau I il résulte que la fréquence de la colicinogénèse, sur 410 souches examinées, est de  $2,6 \pm 0,7$  p. 100. Si l'on en excepte les *S. typhi*, le pourcentage de souches colicinogènes est de  $3,5 \pm 1,0$  p. 100. Le pourcen-

TABLEAU I. — Sérotypes et souches de *Salmonella* examinées (\*)

GROUPE B : 17 SÉROTYPES ; 90 SOUCHES ; COLICINOGÈNES : 5,5 p. 100.	
<i>S. abortus equi</i> , 1 ; <i>S. arechavaleta</i> , 2 ; <i>S. bredeney</i> , 1 ; <i>S. chester</i> , 4 ; <i>S. derby</i> , 3 ; <i>S. heidelberg</i> , 15 ; <i>S. ituri</i> , 1 ; <i>S. kisangani</i> , 13 ; <i>S. limete</i> , 1 ; <i>S. reading</i> , 1 ; <i>S. ruki</i> , 2 ; <i>S. saint paul</i> , 1 ; <i>S. san diego</i> , 1 ; <i>S. schwarzengrund</i> , 8 ; <i>S. stanleyville</i> , 1 ; <i>S. typhimurium</i> , 29 ; <i>S. typhimurium</i> var. <i>copenhagen</i> , 3 ; <i>S. wagenia</i> , 3.	
GROUPE C <sub>1</sub> : 15 SÉROTYPES ; 70 SOUCHES ; COLICINOGÈNES : 2,8 p. 100.	
<i>S. aequatoria</i> , 1 ; <i>S. bonn</i> , 1 ; <i>S. braenderup</i> , 14 ; <i>S. brazzaville</i> , 1 ; <i>S. cholerae suis</i> , 1 ; <i>S. galiema</i> , 3 ; <i>S. gombe</i> , 6 ; <i>S. infantis</i> , 13 ; <i>S. irumu</i> , 1 ; <i>S. makiso</i> , 2 ; <i>S. montevidéo</i> , 2 ; <i>S. oranienburg</i> , 18 ; <i>S. paratyphi</i> C, 1 ; <i>S. thompson</i> , 1 ; <i>S. virchow</i> , 5.	
GROUPE C <sub>2</sub> : 7 SÉROTYPES ; 19 SOUCHES ; COLICINOGÈNES : 0 p. 100.	
<i>S. akandji</i> , 1 ; <i>S. bonariensis</i> , 1 ; <i>S. bovis morbificans</i> , 5 ; <i>S. kottbus</i> , 1 ; <i>S. munichen</i> , 1 ; <i>S. nagoya</i> , 1 ; <i>S. newport</i> , 9.	
GROUPE C <sub>3</sub> : 2 SÉROTYPES ; 3 SOUCHES.	
<i>S. albany</i> , 2 ; <i>S. kentucky</i> , 1 ;	
GROUPE D <sub>1</sub> : 7 SÉROTYPES ; 128 SOUCHES ; COLICINOGÈNES : 0 p. 100.	
<i>S. dar-es-salaam</i> , 1 ; <i>S. dublin</i> , 12 ; <i>S. enteritidis</i> , 17 ; <i>S. gallinarum-pullorum</i> , 5 ; <i>S. javiana</i> , 1 ; <i>S. kapemba</i> , 2 ; <i>S. typhi</i> , 90.	
GROUPE E <sub>1</sub> : 7 SÉROTYPES ; 46 SOUCHES ; COLICINOGÈNES : 4,4 p. 100.	
<i>S. amager</i> , 2 ; <i>S. anatum</i> , 3 ; <i>S. butantan</i> , 1 ; <i>S. ruzizi</i> , 1 ; <i>S. uganda</i> , 3 ; <i>S. vejle</i> , 7 ; <i>S. westhampton</i> , 1.	
GROUPE E <sub>2</sub> : 5 SÉROTYPES ; 10 SOUCHES ; COLICINOGÈNES : 0 p. 100.	
<i>S. binza</i> , 1 ; <i>S. goerlitz</i> , 1 ; <i>S. hamilton</i> , 2 ; <i>S. newington</i> , 3 ; <i>S. tuebingen</i> , 3.	
GROUPE E <sub>4</sub> : <i>S. seftenberg</i> , 1.	
GROUPE F : 6 SÉROTYPES ; 7 SOUCHES.	
<i>S. aberdeen</i> , 1 ; <i>S. chandans</i> , 2 ; <i>S. chingola</i> , 1 ; <i>S. kisarawe</i> , 1 ; <i>S. pre-toria</i> , 1 ; <i>S. senegal</i> , 1.	
GROUPE G <sub>1</sub> : <i>S. poona</i> , 1.	
GROUPE G <sub>2</sub> : 3 SÉROTYPES ; 5 SOUCHES.	
<i>S. ajiobo</i> , 2 ; <i>S. cubana</i> , 2 ; <i>S. worthington</i> , 1.	
GROUPE H : 4 SÉROTYPES ; 5 SOUCHES.	
<i>S. carrau</i> , 1 ; <i>S. mampeza</i> , 1 ; <i>S. anderstepoort</i> , 2 ; <i>S. siegburg</i> , 1.	
GROUPE I : <i>S. hull</i> , 1.	
GROUPE M : 3 SÉROTYPES ; 5 SOUCHES.	
<i>S. kibusi</i> , 3 ; <i>S. moëro</i> , 1 ; <i>S. tel-aviv</i> , 1.	
GROUPE N : <i>S. urbana</i> , 1.	
GROUPE O : <i>S. adelaide</i> , 1.	
GROUPE P : 2 SÉROTYPES ; 2 SOUCHES.	
<i>S. inverness</i> , 1 ; <i>S. mgulani</i> , 1.	
GROUPE Q : <i>S. champaign</i> , 1.	

(\*) En face de chaque groupe figurent le nombre total de sérotypes et de souches examinés et le pourcentage de souches colicinogènes pour les groupes dont on a examiné au moins dix souches. En face de chaque sérotype figure le nombre de souches examinées appartenant à ce sérotype.

TABLEAU I (suite).

GROUPES R : 3 sérotypes ; 3 souches. <i>S. johannesburg</i> , 1 ; <i>S. bukavu</i> , 1 ; <i>S. bulawayo</i> , 1.
GROUPES S : <i>S. waycross</i> , 1.
GROUPES T : 2 sérotypes ; 3 souches. <i>S. nairobi</i> , 2 ; <i>S. westlaco</i> , 1.
GROUPES U : <i>S. milwaukee</i> , 1.
GROUPES V : <i>S. niaremb��</i> , 1.
GROUPES W : <i>S. deversoir</i> , 1.
GROUPES X : <i>S. bergen</i> , 1.
GROUPES Y : 2 sérotypes ; 2 souches. <i>S. dahlem</i> , 1 ; <i>S. ngozi</i> , 1.
GROUPES Z : <i>S. greenside</i> , 1.
TOTAL : 410 souches ; colicinogènes : $2,6 \pm 0,7$ p. 100.

lage approximatif de positifs par groupe O, où l'on a examiné au moins 10 souches, est le suivant : groupe B, 5,5 p. 100 ; groupe C<sub>1</sub>, 2,8 p. 100 ; groupe E<sub>1</sub>, 4,4 p. 100.

Dans le tableau II, nous avons fait figurer les 11 souches trouvées colicinogènes. Parmi elles, 2 souches de *S. derby* ont été isolées récemment à Léopoldville par coproculture chez l'homme ; la souche colicinog  ne de *S. worthington* est la souche type du Centre International des Salmonella de Copenhague qui nous a été adressée par le Dr L.

TABLEAU II. — Souches colicinogènes.

SÉROTYPE ET GROUPE (par ordre alphabétique)	NOMBRE DE SOUCHES EXAMINÉES	SOUCHES COLICINOGÈNES	TYPE DE COLICINE
<i>S. anatum</i> (E <sub>1</sub> ) .....	31	2	1
<i>S. braenderup</i> (C <sub>1</sub> ) .....	14	2	1
<i>S. derby</i> (B) .....	3	2	1
<i>S. mampeza</i> (H) .....	1	1	1
<i>S. saint-paul</i> (B) .....	1	1	1
<i>S. wagenia</i> (B) .....	3	2	1
<i>S. worthington</i> (G <sub>2</sub> ) .....	1	1	1

Le Minor, de Paris : enfin, les 8 autres souches colicinogènes ont été isolées d'organes d'animaux au Congo Belge et au Ruanda-Urundi. Toutes ces souches produisent la colicine I. Elles appartiennent à 5 groupes O (B, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et H) et à 7 sérotypes différents.

Ces résultats démontrent qu'il n'existe pas de relation entre groupe O, sérotype et colicinogénèse, comme les travaux antérieurs pouvaient le faire supposer.

Il n'existe pas non plus de relation entre la phase et la colicinogénèse, car toutes nos souches biphasiques produisent leur colicine aux deux phases. Ceci était à prévoir car on sait que les *E. coli* mobiles sont aussi colicinogènes que les *Shigella*.

Nous signalons enfin que le caractère colicinog  ne paraît stable chez les *Salmonella*. En effet, 8 de ces souches avaient été isolées entre 1954 et 1958 et conservées sur « blood agar base » à 4   C, tandis

que *S. worthington* est une souche de collection. D'autre part, après passage sur cobaye, le caractère colicinogène de 5 de nos anciennes souches a été maintenu.

RÉSUMÉ. — Nous avons décelé 11 souches de *Salmonella* colicinogènes sur 410 examinées, soit  $2,6 \pm 0,7$  p. 100 (y compris 90 souches de *S. typhi*). Ces 11 souches appartiennent aux groupes B, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et H et à 7 sérotypes différents : *S. anatum*, *S. braenderup*, *S. derby*, *S. mampeza*, *S. saint-paul*, *S. wagenia* et *S. worthington*. Toutes produisent la colicine I. De nos résultats on peut présumer qu'il n'existe pas de relation stricte entre structure antigénique de *Salmonella* et colicinogénèse.

#### SUMMARY

##### COLICIN PRODUCTION BY SALMONELLA. STUDY OF 410 STRAINS.

The authors found 11 colicinogenic strains among 410 studied ( $2,6 \pm 0,7$  p. 100), including 90 *S. typhi* strains.

These 11 strains belong to groups B, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, H and to seven different serotypes : *S. anatum*, *S. braenderup*, *S. derby*, *S. mampeza*, *S. saint-paul*, *S. wagenia*, *S. worthington*. All of them excreted colicin I. There does not seem to exist any strict relationship between antigenic structure and colicinogeny.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- [1] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 298.
- [2] HAMON (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 193.
- [3] PAPAVALASSIOU (J.) et SAMARAKI-LYBEROPOULOU (V.). *Acta microbiol. hellen.*, 1957, **2**, 235.
- [4] PAPAVALASSIOU (J.). *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1960, **40**, 369.
- [5] FREDERICQ (P.). *Ann. Rev. Microbiol.*, 1957, **11**, 7.

## PRÉSENCE DE B5W DANS LA FLORE CONJONCTIVALE NORMALE

par Jeanne ORFILA et Bernard COURDEN.

(Laboratoire de Bactériologie  
et Institut du Trachome de la Faculté de Médecine d'Alger)

Depuis quelques années de nombreux auteurs ont signalé la présence chez l'homme de petits bacilles, assez polymorphes, Gram-négatifs. Leur position taxonomique est encore l'objet de nombreuses discussions, aussi sont-ils presque indifféremment désignés par les termes de B5W, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii*. Au cours d'une étude de la flore bactérienne conjonctivale de 120 sujets sains de la région d'Alger, nous les avons isolés dans les cas.



**ISOLEMENT DES GERMES.** — Les sécrétions sont prélevées dans le cul-de-sac conjonctival inférieur, près de la caroncule, etensemencées sur le milieu solide (Brain Heart infusion agar Difco, additionné d'extrait globulaire) que nous employons systématiquement pour l'étude de la flore oculaire. Les colonies qui se développent sont ensuite déterminées selon les techniques classiques. Parmi celles constituées de bacilles Gram-négatifs, nous avons isolé dix-huit souches de B5AV dont nous rapporterons les caractères.

**TECHNIQUES.** — Ces techniques sont celles proposées récemment par Buttiaux [4], que nous tenons à remercier de son aide et de ses conseils précieux.

1° *Morphologie des corps bactériens*, après coloration de Gram.

2° *Recherche de la mobilité*, par examen entre lame et lamelle d'une culture jeune en bouillon.

3° *Examen au microscope électronique*. Il a été fait pour toutes les souches en raison de l'importance du système ciliaire pour la diagnose de ces microbes.

4° *Détermination du type respiratoire*, par ensemencement de tubes de gélose VF, de 180 × 8 mm.

5° *Action sur les hydrates de carbone*. Nous avons étudié l'attaque des sucres suivants : lactose, glucose, saccharose, et mannitol en solution à 1 p. 100 en milieu liquide ; lactose à 10 p. 100 en milieu solide selon la technique de Buttiaux : le germe est ensemencé en strie centrale ; le virage au jaune du bromocrésol-pourpre dans la partie supérieure du tube indique que le germe transforme le lactose en acide lactobionique.

Pour préciser le mode d'action des bactéries sur les hydrates de carbone et en particulier sur le glucose, nous avons utilisé le milieu de Hugh et Leifson :

Tryptose Difco .....	2	g
ClNa .....	5	g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0,3	g
Agar .....	3	g
Bleu de bromothymol .....	0,03	g
Eau distillée .....	1 000	cm <sup>3</sup>

(Ajuster à pH 7,1).

Lors de l'emploi on porte les tubes dix minutes au bain-marie bouillant pour éliminer les gaz dissous. On ajoute une solution de glucose stérile également régénérée : la concentration finale doit être de 1 p. 100. Après solidification du milieu, les microbes sont ensemencés en piqûre dans deux tubes ; pour l'un, la surface est recouverte d'une couche de 2 cm<sup>3</sup> d'huile de vaseline préalablement régénérée. Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, les résultats peuvent être les suivants :

a) Les deux tubes ont conservé leur coloration verte : le germe est inactif ;  
b) Le tube sans vaseline vire au jaune, l'autre reste inchangé : le germe oxyde le glucose ;

c) Les deux tubes virent au jaune : le glucose est fermenté.

6° *Recherche de l'oxydase* (selon la technique de Kovacs). Le réactif utilisé est le chlorhydrate de tétraméthyle-para-phénylène-diamine. Au moment de l'emploi une solution à 1 p. 100 est préparée ; quelques gouttes servent à imprégner un petit carré de papier filtre. Avec un ensemeur à fil droit, on prélève une grande quantité de germes provenant d'une culture en milieu solide âgée de 24 heures, et on trace une strie sur le papier filtre ainsi préparé. L'apparition d'une coloration bleu-violet immédiate traduit la présence d'oxydase.

7° *Hydrolyse de l'urée*, en utilisant le milieu de Christensen.

8° *Transformation des nitrates en nitriles*.

9° *Production d'indole*.

10° *Utilisation des citrates*.

11° *Sensibilité aux antibiotiques*. Nous l'avons recherchée en milieu solide en utilisant la technique des disques avec les antibiotiques suivants : auréomycine, bacitracine, carbomycine, chloramphénicol, érythromycine, framycétine, néomycine, pénicilline, spiramycine, streptomycine, terramycine.

**RÉSULTATS. — Examen microscopique** — Ces microbes se présentent sous la forme de cocci groupés par deux ou en chaînettes, de coccobacilles et de bacilles allongés. Ils sont Gram-négatifs, bien qu'il ne soit pas rare d'observer quelques cellule bactériennes Gram-positives. Ce polymorphisme avec prédominance des formes coccoïdes est très caractéristique.

Ils sont immobiles, et l'examen au microscope électronique montre l'absence de cils.

**Propriétés biochimiques.** — Les caractères sont les mêmes pour les 18 souches : lactose +, glucose +, saccharose —, mannite —, indole —, citrate +, urée +, nitrate —; lactose à 10 p. 100 +. VF : aérobie strict. Oxydation du glucose +. Oxydase —.

**Sensibilité aux antibiotiques.** — Toutes les souches sont : résistantes à la pénicilline et à la streptomycine; moyennement sensibles à l'auréomycine, la bacitracine, la carbomycine, l'érythromycine, la framycétine, la spiramycine et la terramycine; très sensibles au chloramphénicol et à la néomycine.

**DISCUSSION.** — Les caractères majeurs d'immobilité, d'oxydation du glucose, de production d'acide lactobionique et d'absence d'oxydase permettent de différencier ces germes des *Pseudomonas*, toujours mobiles et possédant une oxydase, des *Achromabacter* qui ne produisent pas d'acide lactobionique, des *Aeromonas* qui font fermenter le glucose. Leur caractère d'aérobiose stricte les sépare des Entérobactéries. Il s'agit donc bien de B5W.

Ces microbes constituent un élément qui n'est pas négligeable de la flore conjonctivale des sujets sains, et nous les avons rencontrés aussi bien chez des enfants que chez des adultes et des vieillards. Au cours des 240 examens de sécrétions conjonctivales, nous avons isolé 622 souches bactériennes, et les 18 souches de B5W représentent

TABLEAU I..

GERMES	NOMBRE DE CAS
B5W .....	3
B5W + Staphylocoque .....	3
B5W + Corynébactérie .....	1
B5W + <i>Neisseria</i> .....	1
B5W + Staphylocoque + Corynébactérie .....	7
B5W + Staphylocoque + Sarcine .....	1
B5W + Staphylocoque + <i>Neisseria</i> .....	1
B5W + Staphylocoque + Corynébactérie + Sarcine + <i>Bacillus</i> .....	1

3 p. 100 de cette flore. Ils sont toutefois beaucoup moins fréquents que les staphylocoques, les corynébactéries et les sarcines, et ils sont le plus souvent associés à ces différentes espèces, ainsi que l'indique le tableau I.

La présence de B5W sur des conjonctives saines n'est pas surprenante, puisque ces germes sont très répandus dans la nature, et qu'ils ont été signalés dans l'eau et dans le sol. On comprend donc aisément qu'ils puissent être trouvés sur les téguments et les muqueuses d'un sujet même en bonne santé. Fergusson et Roberts [2] les ont décelés fréquemment dans le rhino-pharynx.

Chez l'homme, ces microbes ont été décrits surtout dans les conditions pathologiques (septicémies, méningites, etc.) [4]. Peuvent-ils, sur la conjonctive où ils sont assez fréquents, être à l'origine d'infections? Cette question reste encore sans réponse précise, bien qu'il soit vraisemblable que certains bacilles Gram-négatifs signalés au cours des conjonctivites soient des B5W. Chez un nouveau-né atteint de conjonctivite aiguë, nous avons isolé une souche de B5W, mais elle était associée au bacille pyocyanique qui est bien connu comme agent d'infections oculaires.

Enfin la diversité, déjà connue, de la sensibilité des B5W aux antibiotiques doit être à nouveau signalée, car des résultats fort différents des nôtres ont été rapportés, en particulier avec la pénicilline et le chloramphénicol [3].

RÉSUMÉ. — 18 souches de B5W ont été isolées au cours de l'étude de la flore conjonctivale de 120 sujets sains.

## SUMMARY

### PRESENCE OF B5W IN THE NORMAL CONJUNCTIVAL FLORA.

Eighteen strains of B5W (= *Bacterium anitratum* = *Moraxella lowffi*) were isolated from the conjunctival flora of 120 normal individuals.

## BIBLIOGRAPHIE.

- [1] BUTTIAUX (R.) et GAGNON (P.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1959, 10, 121.
- [2] FERGUSSON (W. W.) et ROBERTS (L. F.). *J. Bact.*, 1950, 59, 171.
- [3] LUTZ (A.), GROOTEN (D.), VELU (M.) et VELU (H.). *Revue Immunol.*, 1956, 20, 215.
- [4] LUTZ (A.), GROOTEN (O.), WITZ (A.) et SCHAEFFER (A.). *Strasbourg méd.*, 1958, 3, 204.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Les propriétés lytiques du sérum normal. — II. Obsistine et antigène Vi d'*Eberthella typhi***, par L. COLOBERT et A. KIRN.

**Résultats de l'isolement du bacille tuberculeux dans 55 000 crachats par le teepol 410 basique. Influence du milieu de culture**, par A. TACQUET et F. TISON.

**Fractionnement électrophorétique des protéines et pouvoir protecteur du sérum du rat blanc immunisé contre *Plasmodium berghei***, par M<sup>me</sup> G. CAUSSE-VAILLS, M<sup>lle</sup> J. ORFILA et G. FABIANI.

***Neisseria mucosa* (*Diplococcus mucosus* Lingelsheim).** — II. **Etude antigénique et classification**, par M. VERON, P. THIBAUT et L. SECOND.

## LIVRES REÇUS

**A. Albert.** — *Selective Toxicity*. 1 vol., 233 p., Methuen and Co, édit., Londres, et J. Wiley and Sons, New-York, 1960. Prix : 35 s.

Cet ouvrage, dont c'est la deuxième édition, traite de l'action sélective des différents agents toxiques. Depuis la première édition qui date de 1951, les progrès de la chimiothérapie et de la pharmacodynamie découlant en partie de l'évolution de la biochimie ont permis d'étoffer l'ouvrage (13 chapitres au lieu de 8).

Dans la première partie, on trouve des considérations générales sur la toxicité sélective, l'absorption et l'excrétion des divers agents médicamenteux ainsi que sur l'historique de la chimiothérapie et la pharmacodynamie.

La deuxième partie de l'ouvrage s'attache à dégager les relations entre la structure et l'activité biologique.

Une bibliographie abondante complète cet ouvrage qui apporte une contribution à l'étude du mode d'action des médicaments et d'autres substances biologiquement actives.

B. H.

*Comité mixte OMS/UNESCO d'experts de la Formation à donner aux Enseignants en matière d'Education sanitaire. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 193 ; 21 p. Prix : Fr. s. 1,-, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris).

*Comité d'experts de la Standardisation biologique. Treizième rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 187 ; 48 p. Prix : Fr. s. 1,-, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris).

**J. W. McLaren.** — *Modern trends in diagnostic radiology. Third series* 1 vol., 274 p., Butterworth and Co, édit., Londres, 1960. Prix : 75 s.

Les appareillages et les techniques radiologiques ont fait de grands progrès depuis la parution, en 1953, de la seconde édition de cet ouvrage. Le présent volume décrit les connaissances acquises au cours

de ces sept années. Tous les articles sont rédigés par des spécialistes éminemment qualifiés, appartenant à différents pays d'Europe et d'Amérique. Le nombre des figures a été considérablement augmenté et leur importance accroît la clarté et l'intérêt du texte. Un long chapitre est en particulier consacré à la radiologie du cœur, à l'angiocardigraphie et à la cinéradiographie. H. T.

**J. Grober.** — *Wärmestauung und Schwülekrankheiten.* 1 vol., 200 p., 2 fig., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1960. Prix : 28 M D.

Le livre étudie les répercussions que peut avoir sur l'organisme humain l'influence combinée de la température et de l'humidité atmosphériques, celle des températures excessives observées dans certaines usines ou dans certaines mines, l'action de différents moyens artificiels (bains chauds, bains de vapeur, etc.) utilisés pour élever la température du corps dans un but thérapeutique, celle de la fièvre, et enfin les diverses maladies des pays tropicaux dans lesquelles la chaleur joue un rôle direct ou indirect ; il passe enfin en revue les moyens que possède l'homme pour s'en protéger ou pour traiter ces maladies. H. T.

**R. N. Doetsch.** — *Microbiology. Historical contributions from 1776 to 1908.* 1 vol., 233 p., Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, U. S. A. Prix : 5 \$.

Ce volume est consacré aux savants dont les découvertes ont permis un progrès capital des sciences microbiologiques : Spallanzani, Schwann, Pasteur, Cohn, Tyndall, Koch, Schloesing, Burrill, Lister, Ehrlich, Winogradsky, Warington, Beijerinck, Smith, Orla-Jensen. Après une très brève notice biographique, l'article le plus marquant de chacun de ces chercheurs est reproduit en anglais. C'est ainsi qu'on pourra lire le travail de Spallanzani sur les Infusoires, celui de Pasteur sur la fermentation lactique, celui de Robert Koch qui montre sa maîtrise dans les techniques de culture des bactéries, celui de Winogradsky sur les sulfobactéries, etc. L'ouvrage constitue un abrégé des divers aspects de la microbiologie depuis son origine et est illustré par les portraits de chacun des auteurs étudiés. H. T.

**A.-R. Prévot.** — *Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies.* 1 vol., 120 p., 40 fig., 34 tabl., Editions de la Tourelle, Saint-Mandé, 1960.

Cinquième opuscule de la Collection *Techniques de base* publiée sous la direction de M.-R. Dujarric de la Rivière, cet ouvrage est destiné à diffuser les techniques d'isolement, de culture et de détermination des anaérobies pratiquées à l'Institut Pasteur et sans cesse étendues et améliorées par le Service des Anaérobies.

Après une préface et une introduction qui précisent le but et les limites de l'ouvrage, le chapitre premier expose la définition et les caractères généraux des anaérobies : oxydoréduction, types respiratoires, types réducteurs, colonies, nutrition.



Le deuxième chapitre traite des milieux de culture et des techniques : milieux VF et dérivés, réductose, milieu de Wilson et Blair modifié, milieux sélectifs de Beerens, techniques d'isolement, culture, hémoculture, analyses biochimiques, antibiogramme anaérobie, établissement de la fiche de détermination ; étude des produits de fermentation.

Le troisième chapitre étudie les anaérobies pathogènes : toxino-typhus botulique, tétanique, gangréneuse.

Le quatrième chapitre expose les anaérobies virulentes non toxogènes : Micrococcales, Bactériales, Spirillales, Sporulales, Actinomycétales, Spirochétales.

Le cinquième chapitre traite des bactéries anaérobies non pathogènes d'intérêt scientifique ou industriel : ferments butyriques ou acétonobutyliques, cellulolytiques, pectinolytiques, sulfatoréducteurs, Thio-bactériales.

Résumé et conclusion.

Cet ouvrage intéressera tous les laboratoires de bactériologie, qu'ils soient destinés à la bactériologie médicale, vétérinaire, industrielle ou purement scientifique.

A.-R. P.

**A. Trevor Willis.** — *Anaerobic bacteriology in clinical medicine*. 1 vol., 164 p., 13 fig., Butterworth and Co, Londres, 1960. Prix : 30 s.

Ce petit précis de bactériologie des anaérobies est destiné aux étudiants en médecine de l'Université de Leeds. Après un préambule enthousiaste de C. L. Oakley et une préface non moins enthousiaste de l'auteur, vient une introduction qui limite bien les buts de l'ouvrage.

Un premier chapitre décrit les « Anaerobic Jar ». Le deuxième décrit les milieux. Le troisième traite l'examen et l'identification des anaérobies. Le quatrième donne les caractéristiques des anaérobies pathogènes. Le cinquième étudie les infections anaérobies ; le sixième, la toxicologie des anaérobies.

Appendice, bibliographie (très restreinte), index.

A.-R. P.

**S. C. Dyke.** — *Recent advances in clinical pathology*. Série III, 1 vol., 425 p. J. et A. Churchill, édit., London. Prix : 50 s.

Vingt-cinq exposés sont réunis dans cet ouvrage et groupés en quatre sections. La première section, *Bactériologie*, sous la direction de M. Barber, concerne les staphylocoques résistants aux antibiotiques, les méthodes de diagnostic en virologie, les virus neurotropes, le diagnostic de la toxoplasmose, les progrès récents dans la sérologie de la syphilis, les *E. coli* pathogènes et les contaminations bactériennes des aliments.

La deuxième section, *Chimie pathologique*, envisage notamment les troubles du métabolisme du calcium, l'intérêt de la transaminase sérique et de la déshydrogénase lactique dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde, les anomalies du métabolisme de l'indole, l'électrophorèse sur papier en pathologie clinique.

La section d'*Hématologie* comporte des exposés sur les hémoglobino-pathies, l'utilisation des globules rouges marqués au chrome, le fer radioactif en pathologie clinique, les conditions minima nécessaires

à la transfusion, le traitement chirurgical des hémophiles, les rhumatismes et les collagénoses.

La section d'*Histologie* comprend : le diagnostic histologique des mycoses, les tests cytologiques du chromosome sexuel, les isotopes radioactifs au laboratoire, la ponction rénale, le diagnostic de la maladie de Hirschsprung et l'histochimie. Ainsi on trouve dans cette monographie d'excellentes mises au point, faites par des spécialistes très compétents, et chaque exposé est suivi d'une bibliographie sommaire récente.

A. E.

**A. Gottschalk.** — *The chemistry and biology of sialic acids and related substances*. 1 vol., 115 p., University Press, Cambridge, 1960.

Prix : 22 s. 6 d.

Les acides sialiques (en N-acétylneuraminiques) constituent un groupe important en biologie, ne serait-ce que par leur large distribution dans le monde animal. Leur rôle physiologique à l'heure actuelle, en effet, n'est pas encore bien élucidé. Aussi cette monographie comporte-t-elle essentiellement une étude se rapportant à l'isolement, à la structure, aux propriétés physiques et chimiques, aux réactions d'identification et au dosage. Les derniers chapitres concernent les modes de liaison des acides sialiques dans les produits naturels, les concentrations d'acide sialique dans le sérum humain normal et pathologique et enfin les enzymes qui agissent sur les acides sialiques (neuraminidase et aldolase).

B. H.

*Ciba Foundation Symposium on cellular aspects of immunity*. 1 vol., 495 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1960. Prix : 60 s.

Cet ouvrage mérite de figurer dans la collection des principaux traités d'immunologie parus durant ces dernières années. On y trouve non seulement un certain nombre de communications du plus haut intérêt, mais encore l'essentiel des discussions qui ont suivi ces exposés faits au cours du Colloque d'Immunologie tenu à l'Abbaye de Royaumont, en 1959, sous la direction des professeurs KOURILSKY et GRABAR.

Les différents exposés sont notamment : Nomenclature des cellules ayant une fonction immunologique (FAGRAEUS). Mécanisme de fixation de l'antigène par les cellules (ROBINEAUX). Dégénération de l'antigène protéique par une enzyme intracellulaire (LAPRESLE et WEBB). Etude en cinématographie des plasmocytes (THIERY). Ultrastructure des cellules à compétence immunologique (BERNHARD, GRANBOULAN). Identification des cellules à compétence immunologique (SIMONSEN). Théories de la tolérance immunologique (MEDAWAR). Discussions sur la formation des anticorps par formation des clones (BURNET, LEDERBERG). Transfert des cellules lymphoïdes et rôle dans la formation des anticorps (HARRIS et HARRIS). Formation des anticorps *in vitro* (GRABAR et CORVAZIER). Etude des protéines sériques en relation avec l'immunité et leur origine cellulaire (BURTIN). Fondement cellulaire de la mémoire sérologique (DRESSER et MITCHISON). Propriétés biologiques et immunologiques du facteur de transfert (LAWRENCE). Etude comparative de l'histologie des réactions d'hypersensibilité retardée (WAKSMAN). Inter-

actions entre les anticorps humoraux et sessiles au cours de la réaction des homogreffes (GORER). Réaction des nourrissons à l'immunisation active pendant la période néonatale (SMITH). Modifications de la perméabilité capillaire au cours des réactions immunologiques (VOISIN et TOULLET). Mécanisme de la fixation de l'anticorps anaphylactique sur le tissu vivant *in vitro* (HALPERN et coll.).

Auto-anticorps multiples vis-à-vis de constituants cellulaires au cours du lupus érythémateux généralisé (GOOD, KUNKEL, HOLMAN et DEICHER). Action *in vitro* des complexes antigène-anticorps sur les thrombocytes et les érythrocytes. Et enfin, discussion de groupe.

Chacun de ces exposés intéresse non seulement l'immunologiste, mais tous ceux qui doivent être au courant des progrès récents de ce domaine de la biologie.

Un grand nombre des documents qui sont communiqués n'avaient pas été publiés antérieurement. A. E.

L. E. Hawker, A. H. Linton, B. F. Folkes et M. J. Carlile. — *An introduction to the biology of micro-organisms*. 1 vol., 452 p., Arnold, édit., Londres, 1960. Prix : 35 s.

Ce livre est une introduction à l'étude de la microbiologie. Il s'adresse aux étudiants dont la microbiologie fait partie du programme d'études, qu'ils se destinent à la biologie ou à l'agriculture. Il comprend trois parties : la morphologie et le cycle des micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires, algues, virus), la physiologie et le métabolisme des micro-organismes (chimie, métabolisme, nutrition, croissance, différenciation et reproduction, survie, vie ralentie, sénescence et mort), et enfin l'écologie (microbiologie du sol, de l'air, de l'eau, des plantes, des animaux, des aliments et produits commerciaux, fermentations industrielles). Chaque chapitre est suivi d'une bibliographie des ouvrages essentiels se rapportant à la question traitée. Dans l'appendice sont indiquées quelques techniques microbiologiques.

La présentation de ce livre, agrémenté de schémas et de microphotographies, est excellente. L. L.

A. Vessereau. — *Méthodes statistiques en biologie et en agronomie*. 2<sup>e</sup> tome de la série *Recherche et expérimentation en agriculture*, par F. Bœuf et A. VESSEREAU. 1 vol., 538 p., Baillière et Fils, édit., Paris, 1960. Prix 55 NF.

L'édition précédente du livre de statistique de VESSEREAU fut l'un des premiers ouvrages publiés en France qui rassemblait les principales méthodes mathématiques appliquées à l'agriculture et la biologie. L'utilité de l'analyse statistique n'a plus à être justifiée et elle est devenue indispensable à tous les biologistes. Beaucoup d'entre eux connaissent le « Vessereau » auquel ils ont souvent eu recours. Aussi le succès de cette deuxième édition est-il assuré. Les bases mathématiques ont été renforcées, le chapitre relatif à la variable  $\chi^2$  est plus longuement développé, l'analyse de la variance présentée sous une forme plus générale, les tables et les abaques relatives à la loi binominale et à la loi de Poisson complétées. Bien que ce livre s'adresse surtout

aux agronomes, regrettons pour les microbiologistes qui, dans leurs expériences, ont le plus souvent affaire aux lois du « tout ou rien », que l'auteur n'ait pas traité la méthode des « probits ». Mais il a voulu que son livre donne « une initiation suffisante pour traiter un assez grand nombre de problèmes et permette d'accéder ensuite à des techniques plus spécialisées et plus fines ».

L. L.

**Moshe Prywes.** — *Medical and Biological Research in Israel*. 1 vol., 562 p., the Hebrew University of Jerusalem, 1960. Prix : 8 \$.

Dans ce livre, très richement documenté, sont réunies les recherches dans le domaine de la biologie et de la médecine effectuées pendant la brève période (dix ans) d'existence de l'Etat d'Israël. Divisé en neuf sections, puis en nombreux chapitres, il embrasse tous les problèmes vitaux pour le pays. Chaque chapitre est suivi d'une abondante bibliographie. Le livre donne une idée des institutions scientifiques et sociales, de la santé publique, la médecine sociale, la médecine vétérinaire et diverses recherches agricoles. Il est utile comme base de renseignements sur les activités scientifiques très dynamiques dans toutes les branches de la biologie.

S. S.-R.

**J. G. Horsfall et A. E. Dimond.** — *Plant pathology. An advanced treatise*. Vol. III. *The diseased population. Epidemics and control*. 1 vol., 675 p., Academic Press, New York et Londres. Prix : 22 \$.

Dans le volume III de ce traité sont étudiées la première phase de la pathologie des populations de plantes, c'est-à-dire l'infection et les mesures qui permettent de la prévenir.

L'inoculum est d'abord étudié : sa potentialité, sa dispersion, soit autonome dans le sol, la graine et la plante, soit par différents agents biologiques, les insectes en particulier, et physiques, l'air et l'eau.

L'analyse des facteurs qui favorisent les épidémies sert d'introduction aux chapitres suivants, où sont passés en revue les moyens de contrôle de l'infection. Ce seront : la prévision des épidémies, la quarantaine, les pratiques culturales, le traitement du sol, les fongicides considérés du point de vue de leurs propriétés chimiques et biologiques, les agents biologiques qui peuvent s'opposer au développement du pathogène, l'antagonisme microbien, le bactériophage et les prédateurs ; enfin, le dernier chapitre traite du problème de la production de variétés de plantes résistant aux agents pathogènes.

Chaque problème posé est étudié à la fois du point de vue théorique et pratique, et des références bibliographiques sont données à la fin de chaque chapitre.

G. S.

# TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 99

## Notice nécrologique.

† Armand NÉVOT (1891-1960) .....	916
<hr/>	
AKSOYCAN (N.) et LE MINOR (L. et S.). — Antigènes communs entre les <i>Candida</i> et les <i>Salmonella-Arizona</i> .....	723
ALOUF (J. E.) et RAYNAUD (M.). — Suppression du pouvoir inhibiteur du fer sur la toxinogénèse diphtérique par la levure (effet levure) .....	708
ANDRÉ (J.), AUDEBAUD (G.) et CHAMBON (L.). — Diagnostic de la diphtérie sur culture de tissu .....	179
ANDREJEV (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Activité lipasique des bacilles tuberculeux et des Mycobactéries atypiques .....	56
— — — Essais de différenciation des Mycobactéries sensibles et résistantes à l'INH à l'aide de tests quantitatifs et qualitatifs de l'activité peroxydasique .....	821
ANDRIEU (G.). — Les vaccinations antirabiques au Centre Hospitalier Régional de Toulouse en 1959 .....	177
ARTZET (F.). — Antigène herpétique fixant le complément ....	777
— Antigène poliomyélitique pour fixation du complément ..	852
AUDEBAUD (G.). — Voir ANDRÉ (J.).	
AUDRIN (J.). — Mise au point d'une méthode de mesure de la sensibilité des bacilles tuberculeux aux antibiotiques présents dans le sérum des malades .....	757
AUGIER (J.) et MOREAU (R.). — L'activité amylolytique des sols. Méthode d'étude et interprétation .....	131
— Voir MOREAU (R.).	
BADIN (J.). — Voir LOISELEUR (J.).	
BAGDASARIAN (G.). — Influence de la streptomycine sur la production de la pénicillinase induite chez <i>B. cereus</i> .....	150
BARBU (E.), SELIGMANN (M.) et JOLY (M.). — Réactions entre des ADN diversement dénaturés ou dégradés et les anticorps anti-ADN du sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé .....	695
BEERENS (H.) et CASTEL (M. M.). — Action de la bile sur la croissance de certaines bactéries anaérobies à Gram négatif..	454



BENOIT (J.-Cl.). — Voir PANISSET (M.).	
BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1959 .....	173
BEUMER (J.) et DIRKX (J.). — Influence de la composition cationique du milieu sur la fixation des bactériophages sur les récepteurs bactériens isolés .....	146
BIZZINI (B.). — Voir RAYNAUD (M.).	
BOISVERT (H.). — L'identification des Mycobactéries par la recherche de l'acide nicotinique .....	600
BONISSOL (M <sup>me</sup> C.). — Voir LÉPINE (P.).	
BOYER (F.). — Association sérum-antibiotiques dans la streptococcie expérimentale de la souris .....	433
— Vaccination d'animaux de laboratoire avec des streptocoques. I et II .....	897
— Voir CHEDID (L.).	
BRÈS (P.), CAMAIN (R.) et DARRASSE (H.). — Note sur le diagnostic de la variole au laboratoire. II. Méthode d'inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet. ....	92
BRETEY (J.). — Voir MOUREAU (M. H.).	
BRISOU (J.). — Microflore d'un lac salé saharien .....	450
BRUN (E.). — Voir KADA (T.).	
BRYGOO (E. R.). — Voir DODIN (A.).	
BUCHANAN-DAVIDSON (D.) et OUDIN (J.). — Dosage des anticorps par diffusion dans les gels. Comparaison avec les résultats tirés des dosages d'azote précipité .....	376
BURDIN (J.-C.). — Voir HELLUY (J.-R.).	
CAMAIN (R.). — Voir BRÈS (P.).	
CAPRON (A.). — Voir DODIN (A.).	
CARRÉ (M <sup>me</sup> M.-C.). — Voir LÉPINE (P.).	
CARVALHO DE SOUSA (J.). — Contribution à l'étude de la poliomyélite dans les îles du Cap Vert .....	202
CASTEL (M. M.). — Voir BEERENS (H.).	
CATEIGNE (G.), FAUCONNIER (B.), THIBON (M.) et HANNOUN (Cl.). — La pandémie de grippe A2 de 1957. Ses caractéristiques et son évolution en France .....	401
CAYEUX (P.). — Voir WAHL (R.).	
CHALVIGNAC (M.-A.). — Sur les difficultés rencontrées dans la caractérisation des souches bactériennes telluriques .....	459
— Voir KAISER (P.).	
CHAMBON (L.). — Voir ANDRÉ (J.).	
CHAMPEUIL (R.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (M <sup>me</sup> S.).	
CHARPENTIER (M.). — Répartition des microorganismes cellulolytiques du sol. I. Les techniques .....	153
CHATELAIN (R.). — Voir VÉRON (M.).	
CHEDID (L.) et BOYER (F.). — Nouvelles recherches sur l'action histamino-sensibilisante de <i>H. pertussis</i> (phase 1) .....	314

— — et POPHILLAT (M <sup>me</sup> F.). — Hypophyse et typhoïde expérimentale du rat blanc .....	264
CLUZEL (R.), VERNER (M.), VAURS (R.) et CLUZEL-NIGAY (M.). — Comparaison du pouvoir bactéricide des associations d'antibiotiques au sein du groupe érythromycine-spiramycine-carbomycine-oléandomycine sur les staphylocoques pathogènes .....	875
CLUZEL-NIGAY (M.). — Voir CLUZEL (R.).	
COCHRANE (Ch. G.). — La technique des anticorps fluorescents. Applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus. ....	329
COLETSOS (P. J.). — Milieux et modalités de culture adaptés à la réanimation et à la multiplication <i>in vitro</i> de <i>M. tuberculosis</i> de vitalité réduite, de viabilité éphémère, ou en état de quiescence .....	475
COLOBERT (L.) et CREACH (O.). — Structure de la paroi ectoplasmique. Nature et localisation du substrat du lysozyme... ..	672
— et FONTANGES (R.). — Interférence d'un inhibiteur au cours du développement de <i>Myxovirus parainfluenzae</i> I en œuf de poule embryonné .....	839
— et KIRN (A.). — Les propriétés lytiques du sérum. I. Individualisation d'un facteur du sérum humain normal : l'obsistine .....	69
COURCON (J.). — Voir GRABAR (P.).	
COURDEN (B.). — Voir ORFILA (J.).	
CREACH (O.). — Voir COLOBERT (L.).	
DAGUET (G.-L.). — Séroneutralisation des virus poliomyélitiques..	103
DARRASSE (H.). — Voir BRÈS (P.).	
DEMARCHI (J.) et NICOLI (J.). — La multiplication des agents des trypanosomiasés humaines africaines en cultures de tissus. ....	120
DEGOMMIER (J.). — Contribution à la connaissance du mode de multiplication du bacille tuberculeux. Les bacilles acidophiles. ....	767
DERLOT (E.). — Voir WAHL (R.).	
DIDIER (J.). — Voir ENJALBERT (L.).	
DIRKX (J.). — Voir BEUMER (J.).	
DODIN (A.), CAPRON (A.) et BRYGOO (R.). — Etude biomorphologique et manométrique de l'oxydation enzymatique de quelques composés phénoliques par les glandes vitellines de certains Trématodes .....	533
— Voir RANDRIAMBOLOLONA (R.).	
DUBOIS (O.). — Voir LÉPINE (P.).	
DUFAU-CASANABE (J.). — Voir MOUSTARDIER (G.).	
DULONG DE ROSNAY (Ch.). — Voir MOUSTARDIER (G.).	
DUSONCHET (H.). — Voir THIVOLET (J.).	
EDLINGER (E.). — Voir ROSENTHAL (H. A.).	
EDWARDS (P. R.). — Voir LE MINOR (L.).	

- ENJALBERT (L.), DIDIER (J.), LARENG (M. B.) et LAPCHINE (L.). — Les  
adénovirus. Etude de 17 souches isolées à Toulouse .... 608
- EXQUEM (A.). — Voir PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.).
- FAGUET (M.). — Effet inducteur de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de  
phage par la souche lysogène *E. coli* K12 (λ) ..... 297
- FAUCONNIER (B.). — Voir CATEIGNE (G.).
- FAURE (M<sup>lle</sup> M.) et PILLOT (J.). — Composition antigénique des Tré-  
ponèmes. III. L'antigène lipidique de Wassermann ..... 729
- FONTANGES (R.). — Voir COLOBERT (L.).
- FRAPPIER (A.). — Voir PANISSET (M.).
- GALLUT (J.). — Contribution à l'étude du complexe antigé-  
nique « O » des vibrions. Relations immunologiques  
entre *V. cholerae* et les vibrions dits inagglutinables .... 28
- Action de la chlorpromazine sur l'intoxication et l'infec-  
tion expérimentales de la souris par la toxine et les  
vibrions cholériques ..... 813
- Voir NICOLLE (P.).
- GEORGESCO (P.). Voir NASTA (M.).
- GERNEZ-RIEUX (Ch.). — Voir ANDREJEW (A.).
- GIUNTINI (J.). — Voir HANNOUN (Cl.).
- GLAUDOT (A.). — Voir VASSILIADIS (P.).
- GRABAR (P.), URUEL (J.) et COURCON (J.). — L'analyse immuno-  
électrophorétique du sérum humain normal. VI. Mobi-  
lités électrophorétiques ..... 13
- GROSPIRON (D.). — Voir THIVOLET (J.).
- GRUMBACH (F.). — Activité antituberculeuse expérimentale de deux  
dérivés de phénazine pigmentée (B 663 et B 720) seuls et  
associés à d'autres antituberculeux (isoniazide et éthio-  
niamide) ..... 567
- HANNOUN (Cl.), PRUDHOMME (R.-O.) et GIUNTINI (J.). — Action des  
ultrasons sur les propriétés biologiques du virus de la  
grippe ..... 188
- Voir CATEIGNE (G.).
- HELLUY (J.-R.), LAVERGNE (E. de), BURDIN (J.-C.) et PERCEBOIS (G.).  
— L'allergie cutanée dans la pseudotuberculose expéri-  
mentale du lapin ..... 891
- HUET (M.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (M<sup>me</sup> S.).
- JACOB (M.). — Voir MOREAU (R.).
- JACQUELINE (F.). — Voir PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.).
- JANOWSKA (M<sup>me</sup> J.). — Comparaison de deux souches de peste por-  
cine au moyen de l'interférence avec le virus grippal en  
cultures cellulaires ..... 792
- JOLY (M.). — Voir BARBU (E.).
- KADA (T.), BRUN (E.) et MARCOVICH (H.). — Comparaison de l'induc-  
tion de mutants prototrophes par les rayons X et U.V.  
chez *E. coli* B/r Try- ..... 547

KAISER (P.) et CHALVIGNAC (M.-A.). — Une méthode nouvelle pour la mesure quantitative de l'activité pectinolytique aérobie des terres .....	462
KERREST (J.). — <i>Argas persicus</i> , véhicule éventuel de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>hominis</i> .....	924
KIRN (A.). — Voir COLOBERT (L.). — Voir TULASNE (R.).	
KOLOCHINE-ERBER (B.) et MAILLOUX (M.). — Les leptospiroses porcines en France. Seconde enquête et isolement de <i>Leptospira pomona</i> .....	359
KREMBEL (J.). — Voir TULASNE (R.).	
LAPCHINE (L.). — Voir ENJALBERT (L.).	
LAPRESLE (Cl.) et WEBB (T.). — Etude de la dégradation de la sérumalbumine par un extrait de rate de lapin. VII. Isolement et propriétés d'un fragment d'albumine .....	523
LARENG (B.). — Voir ENJALBERT (L.).	
LATRILLE (J.). — Voir MOUSTARDIER (G.).	
LAVERGNE (E. de). — Voir HELLUY (J.-R.).	
LECOCQ (M <sup>me</sup> E.). — Voir LINZ (R.).	
LE MINOR (L.) et EDWARDS (P. R.). — Présence de trois phases de l'antigène flagellaire chez les bactéries du groupe <i>Salmonella</i> .....	469
— Voir AKSOYCAN (N.).	
— Voir NICOLLE (P.).	
LE MINOR (M <sup>me</sup> S.). — Voir AKSOYCAN (N.).	
LÉPINE (P.) et BONISSOL (M <sup>me</sup> C.). — Respiration et glycolyse de cellules KB infectées par <i>Myxovirus parainfluenzae</i> type III. .	440
— ROGER (F.) et ROGER (M <sup>me</sup> A.) — Valeur pratique de la « technique cinétique » de séroneutralisation pour le diagnostic sérologique de la poliomyélite .....	1
— SAMAILLE (J.), MAURIN (J.), DUBOIS (O.) et CARRÉ (M <sup>me</sup> M.-C.). — Isolement du virus ECHO 14 au cours d'une épidémie de crèche de gastro-entérites .....	161
LE QUAN SANG et MAURIN (J.). — Isolement et entretien en lignée continue d'une souche de cellules provenant d'un exsudat péritonéal de lapin (souche EPL) .....	210
LINZ (R.) et LECOCQ (M <sup>me</sup> E.). — Sur la réactivation d' <i>E. coli</i> après traitement par les rayons U.-V. I. Réactivation en bouillon et à l'obscurité .....	743
LOISELEUR (J.), BADIN (J.) et PETIT (M <sup>lle</sup> M.). — Augmentation spécifique de la viscosité de la globuline rhumatoïde par l'addition de $\gamma$ -globuline normale .....	350
MAGARD (H.). — Voir ROBIN (L.-A.).	
MAILLOUX (M.). — Voir KOLOCHINE-ERBER (B.).	
MARCOVICH (H.). — Voir KADA (T.).	

- MAURIN (J.). — Voir LÉPINE (P.).  
 — Voir LE QUAN SANG.
- MÉNANTAUD (J.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (M<sup>me</sup> S.).
- MINCK (R.). — Voir TULASNE (R.).
- MOREAU (R.), JACOB (M.) et AUGIER (J.). — Etude de l'action de la microflores des sols sur différents substrats. Principes et description des techniques ..... 799  
 — Voir AUGIER (J.).
- MOUREAU (M.-H.), BRETEY (J.) et ROY (M<sup>me</sup> D.). — Thermorésistance des Mycobactéries tuberculeuses ; relations avec le pouvoir pathogène. Souches humaines, bovines, BCG, aviaires, paratuberculeuses. I et II ..... 421 et 586
- MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.), PASQUIER (P. du) et LATRILLE (J.). — Un milieu simple pour l'isolement des streptocoques ..... 444  
 — — DUFAY-CASANABE (J.) PASQUIER (P. du) et LATRILLE (J.). — Une méthode chimique de dosage de la kanamycine dans les milieux biologiques ..... 447
- MURAT (M.). — Voir THIVOLET (J.).
- NAKAMURA (K.). — Voir UYEDA (S.).
- NASTA (M.), PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). — Modifications métaboliques et pouvoir pathogène de *Mycobacterium tuberculosis* ..... 504
- NICOLI (J.). — Voir DEMARCHI (J.).
- NICOLLE (P.), GALLUT (J.) et LE MINOR (L.). — Etude lysogénique, lysotypique, sérologique et biochimique d'une collection de vibrions cholériques et de vibrions El Tor ..... 664
- ORFILA (J.) et COURDEN (B.). — Présence de B5W dans la flore conjonctivale normale ..... 929
- UDIN (J.). — Voir BUCHANAN-DAVIDSON (D.).
- PANISSET (M.), BENOIT (J.-Cl.), FRAPPIER (A.) et SAINT-PIERRE (J.). — Survie et multiplication du BCG et du bacille tuberculeux chez la souris. Comparaison de vaccins BCG lyophilisés préparés à partir de cultures de trois âges différents .... 496
- PAPAVASSILIOU (J.). — Voir VASSILIADIS (P.).
- PASQUIER (P. du). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- PAUNESCO (E.). — Voir NASTA (M.).
- PERCEBOIS (G.). — Voir HELLUY (J.-R.).
- PETIT (M<sup>lle</sup> M.). — Voir LOISELEUR (J.).
- PIÉCHAUD (M<sup>me</sup> D.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (M<sup>me</sup> S.).
- PIÉCHAUD (M.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (M<sup>me</sup> S.).
- PILLOT (J.). — Voir FAURE (M<sup>lle</sup> M.).
- PLOMMET (M.). — Essais de traitement de la mammite staphylococcique de la vache par vaccination locale ..... 618



PODLIACHOUK (M <sup>me</sup> L.). — Présence dans le sérum humain d'hétéro-agglutinines spécifiques des antigènes A et C du cheval ...	883
— EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). — Observations sur certaines propriétés du facteur sérique G <sup>ma</sup> .....	224
POPHILLAT (M <sup>me</sup> F.). — Voir CHEDID (L.).	
PRÉVOT (A.-R.) et SARRAF (A.). — Recherches sur les odeurs dégagées par les bactéries anaérobies. I. <i>Inflabilis lacustris</i> ....	629
— Voir SEBALD (M <sup>lle</sup> M.).	
PROVOST (A.). — Voir VILLEMOT (J.-M.).	
PRUDHOMME (R.-O.). — Voir HANNOUN (Cl.).	
RANDRIAMBOLOLONA (R.) et DODIN (A.). — Etude de l'évolution de la bactériémie dans onze cas de salmonellose traités .....	278
RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et BIZZINI (B.). — Existence de la toxine tétanique sous plusieurs états d'agrégation .....	167
— Voir ALOUF (J. E.).	
ROBBA (L.) et VIRAT (M <sup>me</sup> J.). — Préparation d'antigènes pour la déviation du complément dans le diagnostic sérologique des affections à virus Cocksackie groupe B .....	784
ROBIN (L. A.) et MAGARD (H.). — Contribution au diagnostic bactériologique des méningites à <i>Listeria monocytogenes</i> ...	905
ROGER (M <sup>me</sup> A.). — Voir LÉPINE (P.).	
ROGER (F.). — Voir LÉPINE (P.).	
ROSENTHAL (H. A.) et EDLINGER (E.). — De l'influence du chloroforme sur le rendement d' <i>E. coli</i> en phages T pairs....	302
ROUX (J.). — La multiplication des formes L .....	286
ROY (M <sup>me</sup> D.). — Voir MOUREAU (M.-H.).	
SAINT-PIERRE (J.). — Voir PANISSET (M.).	
SAMAILLE (J.). — Voir LÉPINE (P.).	
SARRAF (A.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).	
SARTIAUX (P.). — Voir VASSILIADIS (P.).	
SCHMITT (J.). — Voir HELLUY (J.-R.).	
SEBALD (M <sup>lle</sup> M.) et PRÉVOT (A.-R.). — Etude qualitative et quantitative du pouvoir lipolytique de 86 souches de <i>Clostridium</i> anaérobies .....	386
SELIGMANN (P.). — Voir BARBU (E.).	
SUIRE (M <sup>lle</sup> A.). — Les vaccinations anti- <i>Brucella</i> par la souche vivante B112. Etude et comparaison de différentes méthodes sur souris .....	241
SZTURM-RUBINSTEN (M <sup>me</sup> S.). — Pouvoir pathogène expérimental et activité catalasique des <i>Shigella</i> .....	305
— CHAMFEUIL (R.), HUET (M.) et MÉNANTAUD (J.-A.). — A propos d'une culture de <i>Shigella sonnei</i> isolée de glace alimentaire .....	456
— PIÉCHAUD (M <sup>me</sup> D.) et PIÉCHAUD (M.). — De quelques caractères des vibriions saprophytes .....	309

- TACQUET (A.). — Voir ANDREJEW (A.).
- THIBON (M.). — Action du benzododécinium sur la multiplication du virus grippal ..... 414  
— Voir CATEIGNE (G.).
- THIVOLET (J.) et DUSONCHET (H.). — Etude comparée de l'agglutination des hématies de poussin dans les hépatites infectieuses dites virales et dans d'autres affections hépatiques ..... 142  
— GROSPIRON (D.) et MURAT (M.). — Mise en évidence par les techniques d'immunofluorescence d'anticorps au cours de l'infection syphilitique ..... 920
- TULASNE (R.), MINCK (R.), KIRN (A.) et KREMBEL (J.). — Délimitation de la notion de formes L des bactéries : protoplastes, sphéroplastes et formes L ..... 859
- TURPIN (A.). — Voir RAYNAUD (M.).
- URIEL (J.). — Voir GRABAR (P.).
- UYEDA (S.) et NAKAMURA (K.). — Une *Mycobactérie* chromogène constamment isolée du crachat d'une malade suspecte de tuberculose pulmonaire ..... 319
- VASSILIADIS (P.), PAPA VASSILIOU (J.), GLAUDOT (A.) et SARTIAUX (P.). — Production de colécines chez les *Salmonella* ..... 926
- VAURS (R.). — Voir CLUZEL (R.).
- VERNER (M.). — Voir CLUZEL (R.).
- VÉRON (M.) et CHATELAIN (R.). — Etude comparative de milieux complexes favorisant la fermentation glucidique des *Pseudomonas* ..... 253
- VIALAT (Ch.). — Voir BÉQUIGNON (R.).
- VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). — Isolement au Tchad de microorganismes du groupe de la péripneumonie appartenant à l'espèce *Mycoplasma (Asterococcus) homonis* ..... 114
- VIRAT (M<sup>me</sup> J.). — Voir ROBBA (L.).
- WAHL (R.), CAYEUX (P.) et DERLOT (E.). — Pouvoir pathogène particulier de streptocoques à colonies rugueuses, du type 39 du groupe A. Etude immunologique de leurs extraits Lancefield ..... 654
- WEBB (T.). — Voir LAPRESLE (Cl.).

# TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 99

<i>Acide désoxyribonucléique. Voir Lupus érythémateux.</i>	
<i>Adénovirus. Etude de 17 souches isolées à Toulouse</i> .....	608
<i>Anaérobies. Etude qualitative et quantitative du pouvoir lipidolytique de 86 souches de Clostridium</i> .....	386
— Action de la bile sur la croissance de certains — à Gram négatif .....	454
— Recherches sur les odeurs dégagées par les — .....	629
<i>Antibiotiques. Influence de la streptomycine sur la pénicillinase induite chez B. cereus</i> .....	150
— Méthode chimique de dosage de la kanamycine dans les milieux biologiques .....	447
— Activité antituberculeuse expérimentale de deux dérivés de phénazine pigmentée (B 663 et B 720) seuls et associés à d'autres antituberculeux (INH et éthioniamide) .....	567
— Pouvoir bactéricide des associations d' — sur les staphylocoques pathogènes .....	875
— Voir aussi <i>B. tuberculeux, Mycobactéries.</i>	
<i>Anticorps. Technique des — fluorescents. Applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus</i> .....	329
— Dosage des — par diffusion dans les gels .....	376
<i>Bacille tuberculeux. Milieux et modalités de culture adaptés à la réanimation et à la multiplication in vitro de M. tuberculosis de vitalité réduite, de viabilité éphémère, ou en état de quiescence</i> .....	475
— Comparaison, chez la souris, de vaccins BCG lyophilisés à partir de cultures de trois âges différents .....	496
— Modifications métaboliques et pouvoir pathogène de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	504
— Méthode de mesure de la sensibilité des — — aux antibiotiques présents dans le sérum des malades .....	757
— La multiplication des — — : les bacilles acidophiles .....	767
— <i>Argas persicus</i> , véhicule éventuel du — — humain .....	924
— Voir aussi <i>Antibiotiques, Mycobactéries.</i>	
<i>Bactéries (physiologie). Réactivation d'E. coli après traitement par les U. V.</i> .....	743
<i>Bactériologie générale. Microflore d'un lac salé saharien</i> ... ..	150

<i>B5W</i> . Présence dans la flore conjonctivale normale .....	929
<i>Bactériophage</i> . Influence de la composition du milieu sur la fixation des — sur les récepteurs bactériens isolés .....	146
— Effet inducteur de $H_2O_2$ sur la production de — par <i>E. coli</i> K12 ( $\lambda$ ) .....	297
— Influence du chloroforme sur le rendement d' <i>E. coli</i> B en phages T pairs .....	302
<i>Brucella</i> . Vaccination de la souris par la souche vivante B112 ....	241
<i>Candida</i> . Antigènes communs entre les — et les <i>Salmonella-Arizona</i> .....	723
<i>Choléra</i> . Relations immunologiques entre <i>V. cholerae</i> et les vibrions dits inagglutinables .....	28
<i>Colicine</i> . Voir <i>Salmonella</i> .	
<i>Coxsackie</i> . Préparation d'antigènes pour la déviation du complément .....	784
<i>Cultures cellulaires</i> . Isolement et entretien d'une souche de cellules provenant d'un exsudat péritonéal de lapin .....	210
<i>Diphtérie</i> . Diagnostic sur culture de tissu .....	179
— Suppression du pouvoir inhibiteur du fer sur la toxinogenèse diphtérique par la levure (effet levure) .....	708
<i>ECHO</i> . Isolement du virus — 14 au cours d'une épidémie de crèche de gastro-entérites .....	161
<i>Fièvre typhoïde</i> . Hypophyse et — — du rat blanc .....	264
<i>Formes L</i> . La multiplication des — — .....	286
— Délimitation de la notion de — — .....	859
<i>Grippe</i> . Action des ultra-sons sur les propriétés biologiques du virus .....	188
— La pandémie de — A2 de 1957 en France .....	401
— Action du benzododécinium sur la multiplication du virus ..	414
— Voir aussi <i>Peste porcine</i> .	
<i>Groupes sanguins</i> . Observations sur certaines propriétés du facteur $Gm^a$ .....	224
— Présence dans le sérum humain d'hétéroagglutinines pour les antigènes A et C du cheval .....	883
<i>Hemophilus pertussis</i> . Nouvelles recherches sur l'action histaminosensibilisante .....	314
<i>Hépatites</i> . Etude comparée de l'agglutination d'hématies de poussin dans les — virales et autres .....	142
<i>Herpès</i> . Antigène herpétique fixant le complément .....	777
<i>Immunologie</i> . Dégradation de la sérumbumaine humaine par un extrait de rate de lapin. VII .....	523
<i>Immuno-électrophorèse</i> . Mobilités électrophorétiques du sérum humain normal .....	13
<i>Leptospiroses</i> . Les — en France. Isolement de <i>L. pomona</i> ....	359

<i>Listeria</i> . Le diagnostic bactériologique des méningites à — <i>monocytogenes</i> .....	905
<i>Lupus érythémateux</i> . Réaction entre des ADN dénaturés ou dégradés et les anticorps anti-ADN du sérum des malades atteints de — — disséminé .....	695
<i>Lysozyme</i> . Nature et localisation du substrat du — dans la paroi ectoplasmique d' <i>E. typhi</i> .....	672
<i>Mammite</i> . Traitement de la — staphylococcique de la vache par vaccination locale .....	618
<i>Mutations</i> . Comparaison de l'induction de mutants prototrophes par les rayons X et U. V. chez <i>E. coli</i> B/r Try- .....	547
<i>Mycobactéries</i> . Activité lipasique des bacilles tuberculeux et des — atypiques .....	56
— Une — chromogène isolée du crachat d'une malade suspecte de tuberculose pulmonaire .....	319
— Thermorésistance des — tuberculeuses ; relations avec le pouvoir pathogène. I et II. ....	421 et 586
— L'identification des — par la recherche de l'acide nicotinique. ....	600
— Différenciation des — sensibles et résistantes à l'INH au moyen de leur activité peroxydasique .....	821
— Voir aussi <i>Bacille tuberculeux</i> .	
<i>Myxovirus</i> . Un inhibiteur au cours du développement de — <i>parainfluenzae</i> I en œuf embryonné .....	839
— Respiration et glycolyse de cellules KB infectées par — <i>parainfluenzae</i> type III .....	440
<i>Obsistine</i> . Voir <i>Sérum</i> .	
<i>Péripleumonie</i> . Isolement au Tchad de microorganismes du groupe de la — appartenant à l'espèce <i>Mycoplasma (Asterococcus) hominis</i> .....	114
<i>Peste porcine</i> . Interférence du virus avec le virus grippal en cultures cellulaires .....	792
<i>Poliomyélite</i> . Valeur pratique de la « technique cinétique de séroneutralisation » pour le diagnostic .....	1
— Séroneutralisation des virus .....	103
— La — aux Iles du Cap Vert .....	202
— Antigène pour fixation du complément .....	852
<i>Pseudomonas</i> . Etude comparative de milieux complexes favorisant les fermentations glucidiques des — .....	253
<i>Pseudotuberculose</i> . L'allergie cutanée dans la — expérimentale du lapin .....	891
<i>Rage</i> . Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1959 ..	173
— Vaccinations antirabiques au Centre Hospitalier Régional de Toulouse en 1959 .....	177
<i>Rhumatisme</i> . Augmentation spécifique de la viscosité de la globuline rhumatoïde par addition de $\gamma$ -globuline normale ..	350



<i>Salmonella</i> . Evolution de la bactériémie dans 11 cas de salmonellose traités .....	278
— Présence de trois phases de l'antigène flagellaire chez des — .....	469
— Production de colicines chez les — .....	926
Sérum. Propriétés lytiques du —. Un facteur du — humain normal : l'obsistine .....	69
<i>Shigella</i> . Pouvoir pathogène expérimental et activité catalasique des — .....	305
— Une culture de — <i>sonnei</i> isolée de glace alimentaire .....	456
<i>Sol</i> . L'activité amylolytique des —. Méthode d'étude et d'interprétation .....	131
— Répartition des microorganismes cellulolytiques du —. Techniques .....	153
— Difficultés rencontrées dans la caractérisation des souches bactériennes du — .....	459
— Nouvelle méthode de mesure quantitative de l'activité pectinolytique des — .....	462
— Action de la microflore des — sur différents substrats. Principes et techniques .....	799
<i>Streptocoques</i> . Association sérum-antibiotiques dans la streptococcie expérimentale de la souris .....	433
— Milieu simple pour l'isolement des — .....	444
— Pouvoir pathogène de — à colonies rugueuses du type 39, du groupe A. Etude immunologique de leurs extraits de Lancefield .....	654
— Vaccination d'animaux de laboratoire avec des — .....	897
<i>Syphilis</i> . Mise en évidence d'anticorps par immunofluorescence...	920
<i>Tétanos</i> . Existence de la toxine sous plusieurs états d'agrégation.	167
<i>Trématodes</i> . L'oxydation enzymatique de quelques composés phénoliques par les glandes vitellines de certains — .....	533
<i>Tréponèmes</i> . Composition antigénique des — : l'antigène lipidique de Wassermann .....	729
<i>Trypanosomes</i> . Multiplication des agents de la trypanosomiase humaine africaine en cultures de tissus .....	120
<i>Variole</i> . Diagnostic de la — au laboratoire .....	92
<i>Vibrions</i> . Quelques caractères des — saprophytes .....	309
— Etude lysogénique, lysotypique, sérologique et biochimique de — cholériques et El Tor .....	664
— Action de la chlorpromazine sur l'intoxication et l'infection expérimentales de la souris par la toxine et les vibrions cholériques .....	813
<i>Virus</i> . Voir aux différents virus.	

# TABLE DES OUVRAGES PRÉSENTÉS OU REÇUS

## DU TOME 99

ALBERT (A.). — <i>Selective toxicity</i> .....	933
BAKER (A.), DAVIES (R. L.) et SIVADON (F.). — <i>Services psychiatriques et architecture. O. M. S.</i> .....	812
<i>Bibliographie de la bilharziose 1949-1958. O. M. S.</i> .....	624
<i>Biochemical (the) response to injury</i> .....	158
<i>Biological problems of grafting</i> .....	326
BISSET (K. A.) et DAVIS (G. H. G.). — <i>The microbial flora of the mouth.</i> .....	812
BURNET (F. M.). — <i>Principles of animal virology</i> .....	467
CAJAL (N.). — <i>Diagnosticul de laborator al inframicrobiozeler umane.</i> .....	325
CAUSEY (G.). — <i>The cell of Schwann</i> .....	153
<i>Ciba Foundation Symposium on cellular aspects of immunity.</i> ...	936
<i>Comité d'experts des drogues engendrant la toxicomanie. 10<sup>e</sup> Rapport. O. M. S.</i> .....	328
<i>Comité d'experts de la lèpre. 2<sup>e</sup> Rapport. O. M. S.</i> .....	326
<i>Comité d'experts de la standardisation biologique. 13<sup>e</sup> Rapport. O. M. S.</i> .....	933
<i>Comité mixte O. M. S./UNESCO d'experts de la formation à donner aux enseignants en matière d'éducation sanitaire. O. M. S.</i> ....	933
DACIE (J. V.). — <i>The haemolytic anaemias congenital and acquired.</i> .....	157
DALRYMPLE-CHAMPNEYS (W.). — <i>Brucellar infection and undulant fever in man</i> .....	159
DARZINS (E.). — <i>The bacteriology of tuberculosis</i> .....	156
DAWKINS (M. R. J.) et REES (K. R.). — <i>A biochemical approach to pathology</i> .....	327
DEBRÉ (R.). — <i>Calendrier des vaccinations</i> .....	626
<i>Deuxième Conférence internationale des Nations Unies sur l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques.</i> .....	468
DOETSCH (R. N.). — <i>Microbiology. Historical contributions from 1776 to 1908</i> .....	934
DYKE (S. C.). — <i>Recent advances in clinical pathology.</i> .....	935
<i>Effets génétiques des radiations chez l'homme. Rapport d'un groupe d'étude. O. M. S.</i> .....	624
<i>Epidémiologie des troubles mentaux. 8<sup>e</sup> Rapport. O. M. S.</i> .....	328
FABRE (J.). — <i>Les œdèmes. Physiopathologie et traitement de la rétention de sel et d'eau</i> .....	156
FLOREY (M. E.). — <i>The clinical applications of antibiotics.</i> .....	627
FLORKIN (M.). — <i>Naissance et déviation de la théorie cellulaire dans l'œuvre de Théodore Schwann</i> .....	812
FLORKIN (M.) et MASON (H. S.). — <i>Comparative biochemistry.</i> .....	468
FOURNIER (J.) et CHAMBON (L.). — <i>La mélioiïdose et le bacille de Whitmore</i> .....	624

GOTTSCHALK (A.). — <i>The chemistry and biology of sialic acids and related substances</i> .....	936
GRABAR (P.) et BURTIN (P.). — <i>Analyse immuno-électrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains</i> .....	625
GROBER (J.). — <i>Wärmestauung und Schwülekrankheiten</i> .....	934
GUNSALUS (I. C.) et STANIER (R. Y.). — <i>The bacteria. A treatise on structure and function</i> .....	325
HAWKES (L. E.), LINTON (A. H.), FOLKES (B. F.) et CARLILE (M. J.). — <i>An introduction to the biology of microorganisms</i> .....	937
HAYHOE (F. G. J.). — <i>Leukaemia. Research and clinical practice</i> ....	467
HERRLICH (A.). — <i>Die Pocken</i> .....	327
HORSFALL (J. C.) et DIMOND (A. E.). — <i>Plant pathology. An advanced treatise. Vol. II et III</i> .....	327 et 938
HOUBEN-WEYL. — <i>Methoden der organischen Chemie. Tome V, vol. 4</i> .....	324
LEDERER (E.). — <i>Chromatographie en chimie organique et biologique. Vol. II</i> .....	626
LEIFSON (E.). — <i>Atlas of bacterial flagellation</i> .....	157
Lèpre (la). <i>Activités internationales 1948-1959. O. M. S.</i> .....	325
Mc LAREN (J. W.). — <i>Modern trends in diagnostic radiology</i> .....	933
MANDAHL-BARTH (G.). — <i>Les hôtes intermédiaires de Schistosoma : Biophalaria et Bulinus africains. O. M. S.</i> .....	159
MITCHELL (J. S.). — <i>Studies in radiotherapeutics</i> .....	468
NATAF (R.), LÉPINE (P.) et BONAMOUR (G.). — <i>Œil et virus</i> .....	913
PARKES (A. S.) et SMITH (A. U.). — <i>Recent research in freezing and drying</i> .....	624
<i>Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels</i> .....	627
PRÉVOT (A. R.). — <i>Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies</i> .....	934
<i>Progrès de l'exploration de la tuberculose. Vol. X</i> .....	626
PRYWES (M.). — <i>Medical and biological research in Israel</i> .....	938
REID (D. D.). — <i>La méthode épidémiologique dans l'étude des troubles mentaux. O. M. S.</i> .....	628
RELYVELD (E. H.). — <i>Toxine et antitoxine diphtériques. Etude immunologique</i> .....	323
REY (L. R.). — <i>Conservation de la vie par le froid</i> .....	328
ROSS (E. J.). — <i>Aldosterone in clinical and experimental medicine. Staining procedures</i> .....	158 812
THOMAS (J.-André). — <i>Problèmes d'ultrastructures et de fonctions nucléaires</i> .....	466
VESSEREAU (A.). — <i>Méthodes statistiques en biologie et en agromonie</i> .....	937
WILLIS (A. T.). — <i>Anaerobic bacteriology in clinical medicine</i> ....	935
WILLMER (E. N.). — <i>Cytology and evolution</i> .....	628
WRIGHT (P. G.). — <i>An introduction to pathology</i> .....	625





